

# **A növényi (Arabidopsis) aktivátor E2F transzkripciós faktorok szerepe a magfejlődésben és a sejtciklus szabályozásában**

**Ph.D. értekezés**

**Szerző: Vaskó-Leviczky Tünde**

**Témavezető: Dr. Magyar Zoltán**

**Szegedi Biológiai Kutatóközpont**

**Növénybiológiai Intézet**

**Növényi Morfogenezis Szabályozása Csoport**

**Biológia Doktori Iskola**

**Szegedi Tudományegyetem**

**Természettudományi és Informatika Kar**

**Szeged**

**2020**

# TARTALOMJEGYZÉK

<b>TARTALOMJEGYZÉK .....</b>	<b>2</b>
<b>RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE .....</b>	<b>4</b>
<b>BEVEZETÉS .....</b>	<b>7</b>
<b>IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....</b>	<b>9</b>
1. A lúdfű ( <i>Arabidopsis thaliana</i> ) és a repce ( <i>Brassica napus</i> ) jelentősége és jellemzése .....	9
2. A magfejlődés jellemzése .....	11
2.1. A magfejlődés folyamatainak jellemzése .....	12
2.2. A magfejlődés folyamatainak molekuláris szabályozása .....	16
2.3. A LEAFY COTYLEDON 1 (LEC1) transzkripció faktor jellemzése .....	18
2.4. Az ABI3-FUS3-LEC2 (AFL) B3 transzkripció faktor család jellemzése .....	20
2.5. A LEAFY COTYLEDON 2 (LEC2) transzkripció faktor jellemzése .....	22
2.6. A WRINKLED 1 (WRI1) transzkripció faktor jellemzése .....	23
3. A növényi sejtosztódás jellemzése.....	25
3.1. Az Arabidopsis E2F-RBR modell .....	29
3.2. Az E2F transzkripció faktorok jellemzése .....	31
3.3. A növényi sejtosztódás sajátosságai az embriófejlődés során .....	35
3.4. A sejtosztódási szabályozás egy új, konzerválódott eleme a DREAM komplex.....	36
<b>CÉLKITŰZÉSEK .....</b>	<b>38</b>
<b>ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK .....</b>	<b>39</b>
1. Kísérleti növények, növények nevelése és szaporítása, becők méret szerinti csoportosítása és gyűjtése .....	39
2. Plazmid konstrukciók létrehozása.....	42
2.1. Genomi DNS tisztítása .....	42
2.2. Genomi klónok létrehozása .....	43
2.3. PCR termékek tisztítása poletilén-glikollal (PEG) .....	43
2.4. Klónozás Gateway <sup>TM</sup> (Invitrogen) módszerrel, homológ rekombináció segítségével .....	44
2.5. BP klónozási reakció .....	44
2.6. LR klónozási reakció (hármass Gateway klónozás).....	45
2.7. Hely specifikus mutációk létrehozása, a Quick change mutagenézis módszerével .....	45
3. Plazmid DNS transzformálása és felszaporítása E. coli (XL-1 Blue) kompetens sejtben .....	46
4. A szelektált bakteriális klónok további ellenőrzése kólonia PCR segítségével .....	46
5. Plazmid izolálása bakteriális tenyészetekből .....	47
6. Plazmid DNS transzformálása és felszaporítása <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (pSoupAgricola/GV3101) sejtekben .....	47
7. <i>Agrobacterium</i> közvetítette genetikai transzformáció, a transzformált <i>Arabidopsis</i> növények antibiotikumon történő szelekciója .....	48
8. Western immunoblot analízis .....	49
9. Fehérje komplexek tisztítása immunológiai eljárással (ko-immunoprecipitálás vagy Co-IP) .....	50
10. RNS tisztítás, cDNS írás és kvantitatív valós idejű PCR (qRT-PCR) .....	51
11. Kromatin immunoprecipitáció (ChIP) .....	52
12. Fehérjék tömegspektrometriás analízise .....	53
13. Embriópreparálás, mikroszkópos vizsgálatok.....	53
14. Bioinformatikai módszerek.....	54

<b>EREDMÉNYEK.....</b>	<b>55</b>
1. Az <i>E2F</i> transzkripció faktorok génexpressziós mintázata a becőfejlődés során .....	55
2. Az <i>E2FA</i> , <i>E2FB</i> és az <i>RBR</i> fehérjék felhalmozódása a becőfejlődés során .....	58
3. Az aktivátor <i>E2FA</i> és <i>E2FB</i> valamint az <i>RBR</i> fehérjék felhalmozódása az embriófejlődés során .....	59
4. A becőfejlődés állapotától függően az <i>E2FA</i> és <i>E2FB</i> transzkripció faktorok aktivátorként és represszorként is képesek szabályozni a sejtciklus szabályozó géneket .....	63
5. Az aktivátor <i>E2F</i> transzkripció faktorok hiányának hatása a kifejlett embriók méretére, az embrionális sejtszámra és a sejt méretre.....	66
6. Az <i>E2FA</i> és <i>E2FB</i> transzkripció faktorok gátolják a magérési gének <i>AFL</i> családjának kifejeződését .....	70
7. Az <i>E2F</i> transzkripció faktorok szerepe az érési <i>WRI1</i> és <i>LEC2</i> gének expressziójában a becőfejlődés során .....	73
8. Az embrionális <i>WRI1</i> és <i>LEC2</i> gének a fiatal csíranövények gyökerében is kifejeződnek és az <i>E2F</i> transzkripció faktorok szabályozása alatt állnak .....	78
9. A mag tartalék tápanyagainak idő előtti felhalmozódása az <i>e2fa-2/e2fb-1</i> dupla mutáns vonalban .....	81
10. Növényi DREAM-fehérje komplexek kimutatása Arabidopsisban és repcében .....	87
<b>DISZKUSSZIÓ.....</b>	<b>94</b>
1. Az aktivátor típusú <i>E2F</i> transzkripció faktorok szerepe a fejlődő embrióban.....	94
1.1. Az <i>E2FA</i> és az <i>E2FB</i> mutációja nincs hatással a fejlődő embrió sejtszámára .....	94
1.2. A mag érése során az <i>E2FA</i> és az <i>E2FB</i> represszorként funkcionál az osztódási fázison keresztülment embrionális sejtekben .....	96
1.3. Az aktivátor típusú <i>E2F</i> transzkripció faktorok a mag fejlődési fázisától függően represszorként működnek az érési géneken.....	97
2. Az embrionális <i>LEC2</i> és <i>WRI1</i> gének gyökér kifejeződését ellentétesen szabályozzák az <i>E2F</i> -ek.....	100
3. A növényi DREAM komplex jelenléte Arabidopsisban és repcében .....	100
4. A repce és az Arabidopsis <i>E2FB</i> fehérjék egymáshoz nagyon hasonló szerkezetűek és funkciójuk.....	103
<b>ÖSSZEFOGLALÁS .....</b>	<b>107</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>111</b>
<b>IRODALOMJEGYZÉK .....</b>	<b>115</b>
<b>PUBLIKÁCIÓS LISTA .....</b>	<b>134</b>
<b>KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....</b>	<b>135</b>
<b>FÜGGELÉK .....</b>	<b>136</b>
<b>NYILATKOZAT .....</b>	<b>145</b>

# RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

35S: karfiolmozaik vírus 35S RNS génjének promótere

ABA: abscisic acid (abszcizinsav), növényi hormon

ABI3: ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3, transzkripció faktor

AFL: ABI3-FUS3-LEC2, B3 transzkripció faktor család

ALY2,3: ALWAYS EARLY2,3, az állati MIP130/LIN9 fehérje növényi megfelelője

AP2/EREBP: APETALA2/ETHYLENE-RESPONSIVE ELEMENT BINDING PROTEIN, transzkripció faktor család

AP2: APETALA 2, transzkripció faktor

APC/C: ANAPHASE-PROMOTING COMPLEX/CYCLOSOME, E3 ubikvitin-ligáz enzimkomplex

ARF: AUXIN-RESPONSE FACTOR, transzkripció faktor család

ARF10: AUXIN RESPONSE FACTOR 10, transzkripció faktor

AS1: ASYMMETRIC LEAVES 1, transzkripció faktor

ATML1: ARABIDOPSIS THALIANA MERISTEM LAYER 1, homeobox transzkripció faktor

BD: BODENLOS, transzkripció faktor

Br: Brassica, repce

BY-2 sejtek: dohány Bright Yellow 2 sejtek

cdc2: CDK a hasadó élesztőben

CDC28: CDK a sarjadó élesztőben

CDK: CYCLIN DEPENDENT KINASE, protein kináz

CDKA;1 és CDKB1;1:növényi CDK-ok

CFP: cián fluoreszcens fehérje

CKI: CYCLIN-DEPENDENT KINASE INHIBITOR, CDK inhibitor fehérje

Co-IP: ko-immunoprecipitáció

Cot: cotyledon, sziklevel

CUC: CUP-SHAPED COTYLEDON, transzkripció faktor

CYCA2;3: A-típusú ciklin, M fázis specifikus ciklin fehérje

CYCD3;1: D-típusú ciklin, G1/S fázis specifikus ciklin fehérje

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol, univerzális DNS-hez kötődő fluoreszcens festék

DB: DNS kötő domén, E2F TF konzervált strukturális eleme

DD: Dimerizációs domén, E2F TF konzervált strukturális eleme

DEL: DP-E2F-Like, Arabidopsis E2F TF-ok

DPA és B : DIMERIZATION PARTNER A és B, E2F dimerizációs partner fehérjék

DREAM komplex: DP, Rb, E2F, MuvB összetételű állati fehérjekomplex

DRM komplex: DP, RB, MuvB összetételű fehérjekomplex fonálféregben

dREAM komplex: RBF, E2F2, MIP összetételű fehérjekomplex Drosophilaban

E2F: ADENO VIRUS E2 FAKTOR, transzkripció faktor

FAMA: basic helix-loop-helix fehérje

FUS3: FUSCA 3, transzkripció faktor

GA/GA3: gibberelic acid  
(gibberellin/gibberellinsav), növényi hormon

GFP: zöld fluoreszcens fehérje

HDA: HISTON DEACETYLASE, hiszton  
deacetiláz

HSP: Heat Shock Proteins, hősokk fehérjék

Hyp: hypocotyl, embrionális szár

IAA: indol-ecetsav (auxin), növényi hormon

IKU1,2: HAIKU 1,2, fehérjék

KRP1-7: KIP-RELATED PROTEIN, CDK  
inhibitor fehérjecsald

LEA: LATE EMBRIOGENESIS  
ABUNDANT, késői emberiógenézisben  
felhalmozódó fehérjék

LEC1: LEAFY COTYLEDON 1,  
transzkripciós faktor

LEC2: LEAFY COTYLEDON 2,  
transzkripciós faktor

MB: Marked box, E2F TF konzervált  
strukturális eleme

MCM3: MINICHROMOSOME  
MAINTENANCE 3, S fázis specifikus  
szabályozó fehérje

MIF: Mitosis-Inducing Factor, mitózist  
indukáló faktor

MINI3: MINISEED 3, transzkripciós faktor

MIP: MYB-Interacting Protein, MYB  
kölcsonható fehérje

MP: MONOPTEROS, transzkripciós faktor

MPF: Mitosis-Promoting Factor, mitózist  
elősegítő faktor

MS: Murashige and Skoog medium, növényi  
táptalaj

MSI1: MULTICOPY SUPPRESSOR OF  
IRA1, az állati CAF1/RBBP4 fehérje növényi  
megfelelője

synMuvB/MuvB: synthetic multivulval class  
B, represszor komplex

MYB: transzkripciós faktor család

MYB3R1-5: növényi MYB TF-ok, amelyek  
strukturálisan és funkcionálisan is hasonlítanak  
az állati MYB TF-okhoz

ORC2: ORIGIN RECOGNITION  
COMPLEX 2, G1/S fázis specifikus fehérje

PcG: Polycomb Group, represszor komplex  
család

PDF2: PROTODERMAL FACTOR 2,  
homeobox transzkripciós faktor

PEG: polietilén-glikol

Ph: floém szállítószövet

PHV: PHAVOLUTA, transzkripciós faktor

PI: propidium jodid

PIN: PIN-FORMED, auxin efflux carrier gén

PIL5: Phytochrome Interacting Faktor-Like 5,  
bHLH típusú transzkripciós faktor

PKL: PICKLE, CHD3 kromatin remodelling  
faktor

PLT: PLETHORA, transzkripciós faktor

PPT: DL-Phosphinotricin, glutamin-szintáz  
enzimet gátló anyag

PRC2: POLYCOMB REPRESSIVE  
COMPLEX 2, PcG fehérjekomplex

QC: quiescent center, gyökér nyugvó központ

RAM: root apical meristem, gyökér apikális  
merisztéma

RB: RETINOBLASZTÓMA, fehérje

RB-kötő elem: az E2F TF konzervált strukturális eleme

RBR: RETINOBLASTOMA-RELATED, RB rokon fehérje Arabidopsisban

RBF: légy (Drosophila) Retinoblasztóma Faktor, fehérje

S1-S4: silique 1-4, becőstádium 1-4

SAM: shoot apical meristem, hajtás apikális merisztéma

SCF: SKIP-CULLIN F-BOX, E3 ubikvitin-ligáz enzimkomplex

SCR: SCARECROW, transzkripció faktor

SHR: SHORTROOT, transzkripció faktor

SIM: SIAMESE, CDK inhibítor fehérje

SSP: Seed Storage Proteins, mag tartalék fehérjék

SOM: SOMNUS, C3H típusú cink finger fehérje

SUT4: cukortranszporter

TAG: triglicerid

TCX5: TESMIN/TSO1-CXC domént tartalmazó fehérje, amely az állati MIP120/LIN54 fehérje növényi megfelelője

TCX6: TESMIN/TSO1-CXC domént tartalmazó fehérje

TD: Transzaktivációs domén, E2F TF konzervált strukturális eleme

TF: transzkripció faktor

TIP: Tonoplast Intrinsic Protein, mag specifikus vakuoláris aquaporin fehérje

TOR: TARGET OF RAPAMYCIN, protein kináz

TT2: TRANSPARENT TESTA 2, transzkripció faktor

TTG1: TESTA GLABRA 1, transzkripció faktor

VAL: VIVIPAROUS ABI3-LIKE, B3 típusú fehérjék

YFP: sárgán fluoreszkáló fehérje

WOX: WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN, transzkripció faktor

WRI1-4: WRINKLED 1-4, transzkripció faktor család

WRKY2: WRKY DNA-BINDING PROTEIN 2, transzkripció faktor

WUS: WUSCHEL, transzkripció faktor

YDA: YODA, MYB-jellegű transzkripció faktor

YUC: YUCCA, monooxygenáz enzim

# BEVEZETÉS

A magasabb szerveződésű állati és növényi eukarióta élőlényekben a növekedési és fejlődési folyamatok egyik kulcsfontosságú eleme a sejtosztódás és differenciálódás közti egyensúly kialakítása. Ez az egyensúlyi feladat meghatározó szerepet játszik a szövetek és szervek létrehozásában, fenntartásában és működésében. Az egyensúly felbomlása állatok esetében rákos daganatok kialakulásához vezethet. A növények szemben az állatokkal egész életük során növekednek és fejlődnek. Ezt a képességüket a merisztematikus régiókban (osztódó szövetekben) található őssejteknek köszönhetik, amelyek az állati megfelelőikhez hasonlóan speciális környezetbe (ún. stem cell niche vagy iniciális) vannak beágyazva. Az őssejtek aszimmetrikus osztódások révén új sejt vonalakat hoznak létre, amelyek a fejlődési programnak megfelelően tovább osztódhatnak, majd differenciálódnak. A növények esetében az osztódások számát a környezeti változások jelentősen módosíthatják, mintegy felülírhatják a genetikai programot. Az elsődleges csúcsi merisztémák (hajtás és gyökér) már nagyon korán, az embrió fejlődése során létrejönnek. Az embrió a magban, a maggal együtt, a megtermékenyítést követően indul fejlődésnek. A növényi magfejlődés két, egymást követő szakaszból áll; a kezdeti morfogenetikus részben az irányított sejtosztódás a fő esemény, amit az érési fázis követ, melyben az embrió eléri végső méretét és ahol a tartalék tápanyagok halmozódnak fel (Holdsworth és mtsai., 2008; Lau és mtsai., 2012; Sun és mtsai., 2010). Az embriógenezis során a sejtosztódási és az érési gének koordináltan fejeződnek ki, de nem igazán ismert még, hogy a fejlődő magban pontosan mi hangolja össze ezeket a folyamatokat. Az embriógenezis utolsó lépése a szárazság tolerálására való képesség megszerzése és a magnyugalmi állapot létrejötte (Devic és Roscoe, 2016). Mezőgazdasági szempontból ezek mind igen fontos folyamatok, amelyek meghatározzák a képződő magok minőségét.

A sejtosztódás az embrió fejlődése során egy szigorúan szabályozott folyamat, amely gyakorlatilag egy meghatározott koreográfia szerint működik, amit döntően a genetikai program irányít. A jelenleg elfogadott modell szerint a sejtosztódást egy evolúciósan konzerválódott transzkripcionális molekuláris mechanizmus vezérli, amely a benne részt vevő szabályozó elemekről az E2F-RB (adenovírus E2 faktor-Retinoblasztóma) nevet kapta. Ez a molekuláris szabályozó mechanizmus a növényekben, és így a növényi fejlődésbiológiai kutatások modellnövényében –*Arabidopsis thaliana*, magyarul lúdfű - is megtalálható. Az *Arabidopsis*-ban egyetlen RB rokon fehérjét azonosítottak (Retinoblasztóma-Rokon, röviden RBR1 vagy RBR), amely három E2F transzkripciós faktorral (E2FA, E2FB, E2FC) képes komplexet alkotni

(Magyar és mtsai., 2016). Az E2FA és az E2FB transzkripciós faktorok túltermeltetése növeli az osztódások számát, míg az E2FC esetében a túltermeltetés gátolja a sejtosztódást a posztembrionális fejlődés során. Ezek alapján az E2FA és E2FB transzkripciós faktorokat aktivátornak, az E2FC-t represszor típusúnak tekintjük (De Veylder és mtsai., 2002; Magyar és mtsai., 2005; del Pozo és mtsai., 2006; Sozzani és mtsai., 2006; Magyar és mtsai., 2012). A legújabb eredmények alapján az állati E2F és RB fehérjék multikomponensű, evolúciósan konzerválódott fehérje komplexekben szabályozzák a sejtciklus folyamatát (ún. DREAM komplexek – Magyar és mtsai., 2016). A növényi és állati életmódbeli különbségek ellenére az E2F-RB molekuláris mechanizmus a növényekben is meglepően jól konzerválódott, de növényi DREAM komplexet eddig még nem azonosítottak.

Nemcsak tudományos, hanem mezőgazdasági szempontból is fontos megérteni, hogyan szabályozódik a magfejlődés. Különösen időszerű ez napjainkban, amikor a folyamatosan növekvő lélekszám és a kedvezőtlen éghajlati változások mellett kellene fokozni a terméshozamot. Az E2F-RBR szabályozás elsősorban, mint a sejtosztódási génnek „kapcsolója” van elkönyvelve, és kevésbé ismert, hogy más folyamatok, és gének működését is irányíthatja. Munkám során kimutattam, hogy az E2F-RBR egy olyan koordinációs mechanizmus központi eleme, amely a fejlődő magban elsősorban az osztódási és az érési folyamatok összehangolásában játszik meghatározó szerepet, míg meglepő módon a sejtosztódást aktiváló funkciója kevésbé hangsúlyos. Sikerült ugyanakkor kimutatnunk az állati DREAM komplexekkel hasonló összetételű növényi fehérje komplexek jelenlétét, amelyek növény-specifikus tulajdonságokkal is rendelkeznek.

Az E2F-RBR szabályozás jobb megértése és megismerése azzal a lehetőséggel kecsegtet, hogy a mezőgazdaságilag fontos növényekben is javítani, fokozni lehet a magok minőségét és a terméshozamot.



# IRODALMI ÁTTEKINTÉS

## 1. A lúdfű (*Arabidopsis thaliana*) és a repce (*Brassica napus*) jelentősége és jellemzése

A növényi molekuláris biológia modellnövénye az *Arabidopsis thaliana*, magyarul lúdfű. Ez az egyszerű gyomnövény a keresztesvirágúak (*Brassicales*) rendjébe tartozik. Egynyári növény, amely 20-25 cm magasra nőhet, hosszúnappal virágzik és főleg száraz gyepeken fordul elő. Virágai fehér szirmúak, tölevelei fogazottak, szárlevelei lándzsásak és ép szélűek. Leveleit szőrök, trichómák borítják. Termése az 5-20 mm hosszú becőtermés, amely 40-60 magot tartalmaz. Gyökérzete egyszerű szerkezetű, főgyökeréről oldalgyökerek ágaznak el. Mely tulajdonságai tették alkalmassá az *Arabidopsis thaliana*-t, hogy a molekuláris növénybiológia és növénygenetika modellnövényévé váljon? Kevés helyet igénylő, kisméretű növény, melynek tenyésztése meglehetősen rövid, megfelelő körülmények között az egész életciklusát befejezheti hat hét alatt. Virágai önbeporzók, amely megkönnyíti a homozigóta utódok létrehozását, ráadásul a keresztbeporzás esélye kicsi, így sok növény nevelhető kis területen. Egyetlen növény több ezer magot produkál (5-10000, Simon, 1994), ezáltal egyszerűen vizsgálhatóak a genotípus és fenotípuseloszlás, valamint az alléloszlási arányok. Nevelhető laboratóriumi körülmények között Petri-csészében, valamint üvegházban is. A zárvatermők közül az *Arabidopsis* rendelkezik az egyik legkisebb genommérettel, öt kromoszómája összesen mintegy 135 Megabázispárból áll. A zárvatermők a növények legkésőbb, körülbelül 120 millió éve kialakult törzse (Borhidi, 1995), így feltehetően a közös eredet miatt számos hasonlóságot mutat a génkollekciójuk. Bár az *Arabidopsis*-nak nincs közvetlen mezőgazdasági jelentősége, a vele végzett kutatások fontos ismereteket adnak a virágos növények molekuláris genetikájáról és fiziológiájáról. A molekuláris biológiai kutatásokban használt legelterjedtebb ökotípusa a Columbia, melynek izolálása és népszerűsítése a magyar származású Rédei György (1921-2008) nevéhez fűződik, aki a Missouri Columbia Egyetemen dolgozott, mint genetikus. A magasabbrendű növények közül az *Arabidopsis* teljes genomját szekvenálták meg először, ami 2000-ben vált hozzáférhetővé (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Genomi DNS-e kis metiláltsági fokkal (6-7%), valamint kevés ismétlődő szekvenciával rendelkezik (Meyerowitz, 1992). Jelenleg 27000 génről és az általuk kódolt 37000 fehérjéről tudunk, melyekről naprakész információ a TAIR (<http://www.arabidopsis.org>) és NASC (<http://arabidopsis.info/>) honlapjain található. Az *Arabidopsis*-szal végzett mutációs kísérleteket Rédei György optimalizálta. A kölni

Max-Planck Intézetben dolgozó szintén magyar származású kutatóval, Koncz Csabával együtt dolgozta ki az *Arabidopsis* Agrobacterium Ti-plazmid (Tumor indukáló-plazmid) T-DNS-ének (Transzfer-DNS) segítségével történő genetikai transzformációját. Ezáltal lehetővé vált a növényi kromoszómákba beépülő inszerciós génmutációk izolálása és azonosítása (Koncz és mtsai., 1992).

Habár az *Arabidopsis thaliana* közvetlen gazdasági jelentőséggel nem rendelkezik, a növénybiológiai kutatások elsőszerű modellorganizmusa. Többek között az *Arabidopsis* modell segítségével vált lehetővé a biomassza keletkezését szabályzó gének és szabályozó hálózatok megismerése. Az *Arabidopsis*-ban megismert molekuláris folyamatok más növényfajok esetében is érvényesek lehetnek, így lehetőség nyílt előnyösebb tulajdonságokkal rendelkező növények létrehozása (Gonzalez és mtsai., 2009). Az *Arabidopsis* közeli rokonságban áll a repcével. Mindkét nemzetség a keresztesvirágúak (*Brassicales*) rendjébe, azon belül pedig a káposztafélék (*Brassicaceae*) családjába tartozik, ebből kifolyólag jó eséllyel használhatók az *Arabidopsis* kutatások által megszerzett ismeretek a repce esetében. A *Brassica* nemzetség számos mezőgazdaságilag fontos olajos magvú fajjal rendelkezik, mint a *Brassica napus* (hétköznapi nevén, repce), a *Brassica juncea* (szareptai mustár) és a *Brassica rapa* (mezei mustár). Gazdasági jelentőségét jól tükrözi, hogy a világon előállított növényi olajok 10 %-át, étolajnak pedig 12 %-át teszi ki a repce magjából sajtolt olaj.

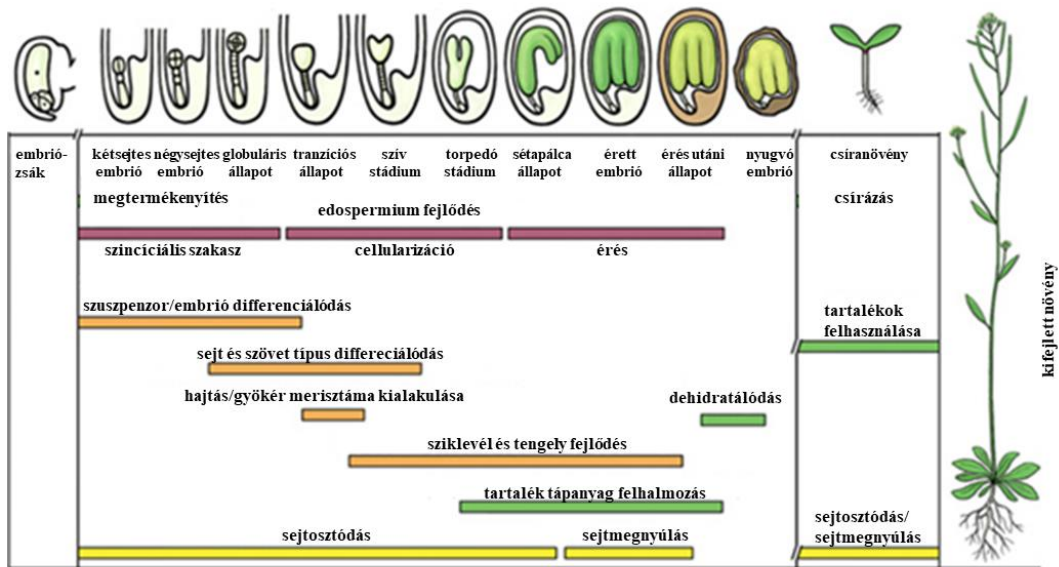
A repce növény 75–125 cm magasra nőhet, levelei kékeszöldek, melyek közül az alsó levelek nyelesek, borzasan szőrösek, a felsők pedig kopaszak, szárölelők. Virágai fürtökben nőnek, szíromlevelei élénksárgák. Fakultatív öntermékenyülő növény (a virágok kétharmad részben öntermékenyülők, egyharmad részben pedig idegen termékenyülők). A repcevirágokat méhek látogatják, de a beporzásában a legfontosabb tényező a szél. Az egyes fajták áprilistól szeptemberig nyílnak. Termése a keskeny becő, amely 5–10 cm hosszú. Egy-egy becőben 15–40 mag található. 1,5-2,8 mm-es magokkal rendelkezik, melyek gömbölydedek, simák vagy barázdáltak. A magok színe lehet vörös, barna vagy fekete, de egyes típusoké akár sárga is. A magok olajtartalma 35-48 %, fehérjetartalma 23-25 %. Tápanyagokkal jól ellátott talajt igényel (Simon, 1994).

A repce hagyományos nemesítése időigényes, 8-10 egymást követő nemzedék szükséges egy új fajta kifejlesztéséhez (Cardoza és mtsai., 2006). Genetikai transzformációjának megvalósulásával lehetővé vált, hogy a repce növény közvetlen módszerrel egyedi génekhez, illetve tulajdonságokhoz jusson, genetikai háttérének sérülése nélkül. Számos olyan direkt géntranszformációs technikát fejlesztettek ki, amely a repce esetében is jól használható, mint a PEG közvetítette transzformáció, az elektroporáció, a mikroinjekció és a gēnpuska (Poulsen,

1996; Puddephat és mtsai., 1996). A repcetranszformálás legjobban elterjedt módszerévé mégis az *Agrobacterium* közvetítette transzformáció vált, költséghatékonyasága és könnyű kivitelezhetősége miatt (Bhalla és Singh, 2008). 2011-re befejeződött a repce genome szekvenálási projekt is (Wang és mtsai., 2011) és létrehozták a Brassica adatbázist (BRAD – Cheng és mtsai., 2011; <http://brassicadb.org/brad/index.php>). Ezzel újabb út nyílt a repce molekuláris tanulmányozására.

## 2. A magfejlődés jellemzése

A magképződés a magasabb rendű növények életciklusának alapvető folyamata, amely két egymást követő generáció között a kapcsolatot és a faj fenntartását jelenti. A mag fejlődése a kettős megtermékenyítés eredményeképpen kialakuló diploid zigótával és a triploid endospermiummal kezdődik és két egymást követő szakaszra osztható. Az első az osztódási szakasz, amit a mag érési fázisa követ. Az osztódási fázis kezdeti, morfogenetikus szakaszában specifikus, aszimmetrikus osztódásoknak is köszönhetően létrejönnek az embrióra jellemző szövetek és szervek, amely a szív-stádiumú embrió kialakulásával gyakorlatilag befejeződik. A morfogenezist követi az embrió növekedési fázisa, ahol a sejtosztódás és a sejtmegnyúlás a két meghatározó folyamat. A növekedési fázis akkor ér véget, amikor az embrió már teljesen kitölti a magzsákban rendelkezésére álló teret. A sejtosztódás aktivitása a növekedési fázis alatt egyre csökken, majd a sejtosztódási gének teljesen kikapcsolódnak és a sejtmegnyúlás folyamata válik dominánsá, és ezzel egyidőben az érési folyamatok is beindulnak. Nem pontosan ismert azonban, hogyan koordinálódnak ezek az események. A sejtosztódási génekkel ellentétesen működnek az érési gének, melynek köszönhetően tartaléktápanyagok halmozódnak fel az *Arabidopsis* embrió sejtjeiben (döntően olajok, triacil-glicerol származékok és a fehérjék, ezek közül meghatározóak az albuminok és globulinok, amelyek az *Arabidopsis* magban elsősorban az embrionális levélben raktározódnak), az embrió pedig az érési fázist követő stádiumban képessé válik a kiszáradás tolerálására. Végül a mag nyugalmi állapotba kerül, amely a csírázással ér véget (Harada, 1997). Az embrióképződés, a tartaléktápanyagok felhalmozódása, és a mag nyugalmi állapot megteremtése mezőgazdasági szempontból mind fontos folyamatok, amelyek meghatározzák a képződő magok minőségét.



**1. ábra: Az Arabidopsis mag fejlődése és főbb szakaszai.**

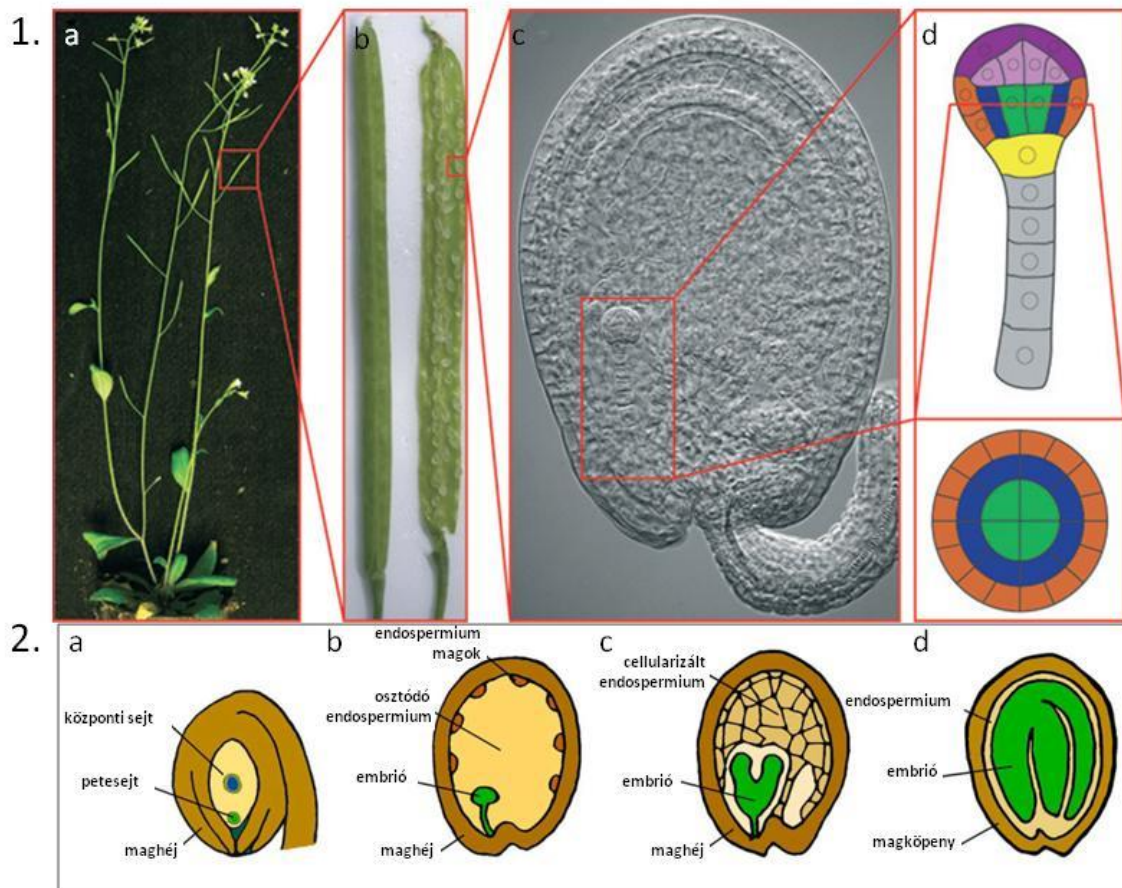
Az Arabidopsis embrió négy fő fejlődési stádiumon megy keresztül: a globuláris, a szív, és a torpedó stádiumokon keresztül éri el az érett embrió stádiumot. Narancssárga szakaszok jelölik az embriógenézis főbb eseményeit, zöld szakasz az embriógenézis utáni eseményeket, citromsárga részek a sejtciklushoz köthető eseményeket, a piros szakaszok pedig az endospermium fejlődésének főbb történéseit mutatja meg (az ábra Le és mtsai., 2010 munkája alapján készült).

## 2.1. A magfejlődés folyamatainak jellemzése

A virágos növények embriógenézisének első lépése a kettős megtermékenyítés, melynek során a hím ivaros nemzedék két hímivarsejtje közül az egyik a női gametofiton petesejtét, a másik pedig a központi sejtjét termékenyíti meg. A megtermékenyített petesejt a zigóta, amelyből az embrió fejlődik, a megtermékenyített központi sejtéből pedig az endospermium jön létre, amely az embriót tápláló szövetté fejlődik. Az embriót tápláló endospermium kezdetben szinciciális fejlődésen megy keresztül, majd cellularizálódik (Olsen, 2001). Habár a növények egyedfejlődése posztembrionális jellegű, a növényi test alapvető felépítése már az embriófejlődés során kialakul. Létrejön a növényekre jellemző apikális-bazális polaritás, amely a hajtás-gyökér tengelyt fogja meghatározni és kialakulnak a szervképző régiók a merisztémák (Goldberg és mtsai., 1994; West és Harada, 1993). Az embrió apikális-bazális polaritásának kialakításában fontos szerepe van az auxinnak (Friml és mtsai., 2003). Az állatokkal szemben, ahol a megtermékenyítést gyors szimmetrikus ún. hasadó osztódások sorozata követi, növényekben a legelső lépés a zigóta megnyúlása, amit közvetlenül egy aszimmetrikus osztódás

követ, amely két különböző méretű és sorsú utódsejtet eredményez. Az apikális, kisebb méretű sejtől jön létre az embrió hajtás része (embrionális levél és szár, valamint a hajtás merisztéma), míg a bazális sejtől az embrió gyökérszerve (hipofízis), valamint az embriót rögzítő szuszpenzor fejlődik ki. Az apikális sejt tovább osztódik, létrejön a nyolcsejtes stádium, amelyben a tangenciális osztódásoknak köszönhetően kialakul az első embrionális szövet, a külső sejtréteg (protoderma). A globuláris embrió további osztódásainak eredményeképpen az embrió közepén található sejtek megnyúlnak, és létrehozzák az alapszövetet, a prokambiumot. Harmadik lépésként a szuszpenzor legfelső sejtéből kialakul a hipofízis lencse alakú sejtje, amely a gyökér nyugvó központját (quiescent center, röviden QC) és a gyökérsüveg iniciálisait hozza létre. A negyedik lépés a globuláris stádiumból a szív stádiumba való átmenet, ekkor alakulnak ki az embrionális levelek (sziklevelek), az Arabidopsis embrió raktározó szervei. Végül a torpedó stádiumban már mind a hajtás, mind a gyökér apikális merisztémák szervezett struktúrákként láthatók. Az érett embrió legalább öt szervkezdeménnyel rendelkezik az apikális-bazális tengely mentén. Ezek a hajtás apikális merisztéma, a sziklevelek, a hipokotil (az embrionális szár), a gyökér és a gyökér apikális merisztéma (West és Harada, 1993). A mag érési szakasza már a szív stádium után megkezdődik, bár ekkor még átfed egymással a sejtosztódás és az érés folyamata. Dominánsá akkor válik a mag érési folyamata, amikor az embrió és az endospermium morfogenezise befejeződött (Wobus és mtsai., 1999). Amennyiben az érési fázist követő nyugalmi állapot nem alakul ki, a teljesen kifejlődött embrió képes kicsírázni, ezt a jelenséget „viviparous pathway”-nek (eleveneszlő útvonal) nevezzük (Vicente-Carbajosa és Carbonero, 2005). A mag érési fázisára a sejmegnyúlásos növekedés a jellemző. Ennek során tartalék tápanyagok szintetizálódnak és halmozódnak fel az embrióban, melyeknek a csírázáskor történő lebomlása biztosítja a fejlődő csíranövények tápanyagait, mielőtt azok fotoszintetikus kapacitása teljesen kialakul (Baud és mtsai., 2002). A mag érésének korai és középső szakaszában az abszcizinsav (abscisic acid, röviden ABA) jelenléte dominál, amely kezdetben az anyai szövetekben, majd később bár kisebb mértékben, de az embrióban és az endospermiumban is szintetizálódik (Nambara és mtsai., 2003). A késői érési szakaszban az ABA szintje lecsökken, végbemennek a dehidratációs folyamatok, melyhez elengedhetetlen a késői embrionális fejlődésben felhalmozódó (LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT, röviden LEA) fehérjék szintetizálódása, így az embrió képessé válik a szárazság tolerálására. A tartalék metabolitok felhalmozódása szénhidrátok, lipidek és fehérjék formájában történik, melyek közül a szénhidrátok az endospermiumban, a lipidek pedig az embrióban raktározódnak. A mag érésének végén a mag nyugalmi állapotba kerül. Ebben az állapotban az érett mag hosszú ideig megőrzi élet- és csírázóképeségét és sokáig át tud vészteni kedvezőtlen körülményeket. A mag nyugalmi

fázisa megfelelő feltételek mellett a csírázással ér véget (Holdsworth és mtsai., 1999). Az ABA mellett a gibberellinnek (gibberelic acid, röviden GA) is fontos szerepe van a mag érésében. Az ABA/GA arány fontos szabályozója a mag érésének. Amikor a mag érésnek indul, ABA tartalma megemelkedik és a magas ABA/GA arány segíti az érést és a nyugalmi fázis kialakulását, valamint gátolja a sejtosztódást, az embrió növekedését és csírázását. Alacsony ABA/GA arány esetén véget ér a mag nyugalmi fázisa és megindul a csírázás (White és mtsai, 2000).



## 2. ábra: Az Arabidopsis termése, a mag és az embrió kialakulása.

1. Az Arabidopsis növények virágzati tengelyén fejlődő becők (1.a) tartalmazzák a magokat (1.b), melyekben az anyai szövetekkel körbevett embrió foglal helyet (1.c). A globuláris állapotú embrió hosszanti (felső ábra) és keresztirányú (alsó ábra) keresztmetszetének sematikus ábrázolása (1.d). A keresztmetszeti képeken a színek a különböző sejttípusokat jelölik: sötétlila: felső domén protoderma, lila: felső domén belső sejtek, piros: alsó domén protoderma, kék: alsó domén belső sejtek, zöld: vaszkuláris prekursor, sárga: hipofízis, szürke: szuszpenzor (Wendrich és Weijers, 2013 munkája alapján).

2. A kettős megtermékenyítést követően a megtermékenyített petesejtből létrejön az embrió, a megtermékenyített központi sejt pedig endospermiummá fejlődik. A megtermékenyítés hatására a maghéj magköpenné való átalakulása is megkezdődik (2.a). Az első fázisban az endospermium gyors osztódások révén egy nagyméretű sok sejtmagú sejtet, ún. szinciciumot formál, mire az embrió eléri a szív stádiumot (2.b). Ezután az endospermium a citokinézis egy speciális formáján megy keresztül, az úgynevezett cellularizáción, melynek során a szinciciumból egyedi sejtek jönnek létre (2.c). A második fázisban az embrió növekedésnek indul és végül kitölti a rendelkezésre álló üreget az endospermium rovására. Érett állapotban az Arabidopsis mag csak egyetlen rétegben tartalmaz endospermium sejteket és az anyai maghéj átalakul magköpenné (2.d; Sun és mtsai., 2010 munkája alapján).

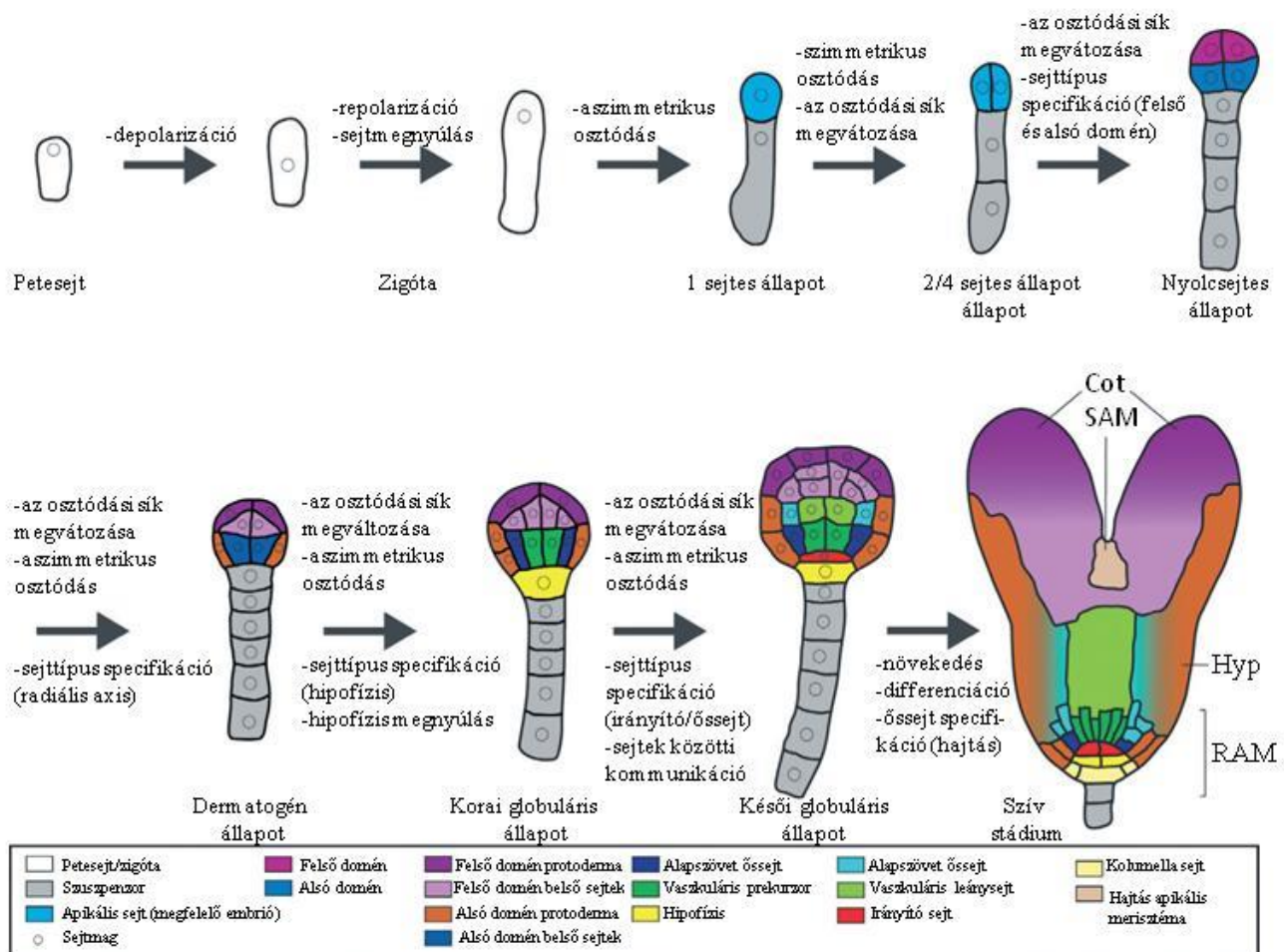


## 2.2. A magfejlődés folyamatainak molekuláris szabályozása

A magfejlődés szabályozásában a különböző hormonok mellett számos transzkripciósfaktor (TF) vesz részt. A kettős megtermékenyítés révén létrejövő zigótában a WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN (WOX) TF-ok (WOX2 és WOX8) együttesen fejeződnek ki, majd a zigóta aszimmetrikus osztódását követően a WOX2 kizárólag az apikális sejtben, míg WOX8 csak a bazális sejtben fejt ki hatását. Ezeknek a TF-oknak fontos szerepük van a régió-specifikus transzkripció programok elindításában (Haecker és mtsai., 2004). A WOX8 kifejeződését a WRKY DNA-BINDING PROTEIN 2 (WRKY2) TF szabályozza, ezáltal meghatározza a zigóta polaritását, osztódási szimmetriáját, a bazális és közvetett módon az apikális sejtsorsot is (Ueda és mtsai., 2011). A zigóta megnyúlását egy MYB-jellegű transzkripciósfaktor, a YODA (YDA) által irányított jelátviteli út szabályozza (Jeong és mtsai., 2011). Az auxin szerepe az apikális-bazális polaritás és a poláris auxin transzport kialakításában a *PIN-FORMED (PIN)* auxin efflux carrier géneken keresztül érvényesül. Két auxin effluxfehérje közül a PIN1 specifikusan az apikális, míg a PIN7 a bazális sejtben fejeződik ki. A zigóta osztódása után a PIN7 auxin áramlást eredményez a bazális sejt felől az apikális sejt felé (Friml és mtsai., 2003). A hipofízis specifikációjában az úgynevezett AUXIN RESPONSE FACTOR-ok (ARF) vesznek részt, az egyik legjobban jellemzett a MONOPTEROS/BODENLOS (ARF5/MP/BD) TF. Ezek az auxin lokális felhalmozódását idézik elő, amely szükséges a gyökérképződéshez (Weijers és mtsai., 2006). A nyolcsejtes állapotú embrióban tangenciális osztódással létrejövő protoderma differenciálódásáért az ARABIDOPSIS THALIANA MERISTEM LAYER 1 (ATML1) és a PROTODERMAL FACTOR 2 (PDF2) homeobox TF-ok a felelősek (Takada és mtsai., 2007; Abe és mtsai., 2003). A radiális mintázat kialakításában vesz részt a SHORTROOT (SHR) és SCARECROW (SCR) TF, melyek a korai embrionális állapotban fejeződnek ki. A SHR a korai globuláris embrió prokambiumában jelenik meg, ahol aktiválja a SCR gént az alapszövetben és a hipofízisben. Mindkét TF fontos szereppel rendelkezik a gyökér radiális szöveti mintázatának kialakításában (Helariutta és mtsai., 2000; Nakajima és mtsai., 2001; Wysocka-Diller és mtsai., 2000). A korai embriogenezis alatt a gyökér merisztéma és a nyugvó centrum (QC) specifikációjáért a WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN 5 (WOX5) és a PLETHORA (PLT) TF-ok (Haecker és mtsai., 2004; Aida és mtsai., 2004), míg a hajtás merisztéma embrionális specifikációjáért a WUSCHEL (WUS) TF felel (Laux és mtsai., 1996; Mayer és mtsai., 1998). A bilaterális szimmetria, vagyis a hajtásmerisztéma és a sziklevél primordiumok elhatárolódásának kialakítását a CUP-SHAPED COTYLEDON (CUC) TF-ok végzik (Aida és mtsai., 1999). A sziklevélkezdemenyek kialakulását és differenciációját az ASYMMETRIC



LEAVES 1 (AS1) mozdítja elő (Byrne és mtsai., 2000). Az endospermium fejlődés szinciciális fázisának szabályozásában a sejtosztódást szabályozó TARGET OF RAPAMYCIN (TOR) kináznak (Menand és mtsai., 2002), míg a cellularizáció folyamatában a KNOLLE és a HAIKU1,2 (IKU1,2) fehérjéknek, valamint a MINISEED3 (MINI3) TF-nak van fontos szerepe (Wang és mtsai., 2010; Luo és mtsai., 2005; Lauber és mtsai., 1997). A mag érésének genetikai szabályozásában a LEAFY COTYLEDON1 (LEC1, CCAAT-box kötő transzkripciós faktor) és három egymással rokon B3 típusú TF, a LEAFY COTYLEDON 2 (LEC2), a FUSCA3 (FUS3) és az ABSCISIC ACID INSENSITIVE3 (ABI3) játszanak kulcsszerepet (Lotan és mtsai., 1988; Stone és mtsai., 2001; Luerksen és mtsai., 1988; Giraudat és mtsai., 1992). Míg a B3 TF-ok együttesen aktiválják a tartalékfehérje gének expresszióját (Kroj és mtsai., 2003), addig a LEC2 TF a csíranövényeken végzett vizsgálatok alapján szabályozza a WRINKLED1 (WRI1) TF kifejeződését is, melynek célgénjei a zsírsavszintézisben szerepet játszó gének (Baud és mtsai., 2007). A szénhidrát felhalmozódás szabályozásában az APETALA2 (AP2) TF-nak van fontos szerepe (Ohto és mtsai., 2005). Az embriogén jellegek és a magfejlődési program gátlásában a VIVIPAROUS ABI3-LIKE (VAL) B3 típusú fehérjék (VAL1, VAL2, VAL3, Suzuki és mtsai., 2007) és a PICKLE (PKL, CHD3 kromatin remodeling faktor) vesz részt (Ogas és mtsai., 1999). A PKL a csírázás során a *LEC* gének negatív szabályozója, ebben két HISTON DEACETYLASE (HDA), a HDA6 és a HDA19 is részt vesz, megerősítve az epigenetikus szabályozás szerepét (Tanaka és mtsai., 2008).



### 3. ábra: Morfogenetikus folyamatok az Arabidopsis embriófejlődése során.

Az Arabidopsis embriógenézisének sematikus áttekintése a petesejttől a szív stádiumú embrióig. Kiemeltük azokat a folyamatokat, amelyek a stádiumok közötti átmenetekhez szükségesek. A színek azonos típusú sejteket jelölnek, markergén expresszió és leszármazási vizsgálatok alapján. Cot: sziklevél (cotyledon); SAM: hajtás apikális merisztéma (shoot apical meristem); Hyp: embrionális szár (hypocotyl); RAM: gyökér apikális merisztéma (root apical meristem; Wendrich és Weijers, 2013. munkája alapján).

## 2.3. A LEAFY COTYLEDON 1 (LEC1) transzkripciós faktor jellemzése

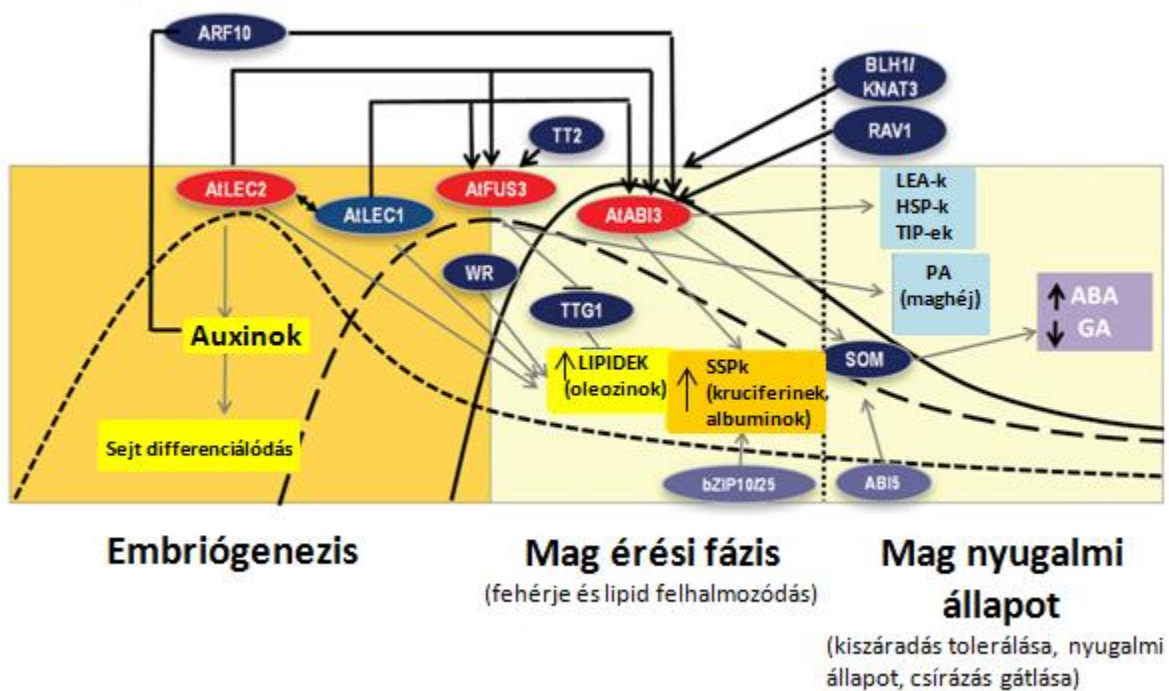
A LEC1 transzkripciós faktor a magfejlődés egyik központi szabályozója, amely a morfogenezis és az érési fázis folyamatait is szabályozza. Részt vesz a mag szárazság elleni toleranciájának kialakításában, szerepe eszenciális, a *LEC1* gén hiányában az embriók nem élnek túl a magfejlődés végén a kiszáradás folyamatát. Hozzájárul a mag tartalék tápanyagainak a felhalmozódásához, mivel a *lec1* mutáns magokban a tartalékfehérjék és a lipidek felhalmozódása gátolódik és csökken azoknak a géneknek az expressziója, amelyek a fehérje és lipid raktározásban vesznek részt. Elnyomja a csíranövény idő előtti fejlődésnek indulását a

magfejlődés során, hiszen a *lec1* mutáns embriók hajtáskezdeményei idő előtt aktiválódnak és levél kezdeményekkel rendelkeznek, míg a vad típus esetében az embrionális hajtás kezdemények inaktívak és nem indul meg a levélfejlődés (Meinke és mtsai., 1992; Meinke és mtsai., 1994; West és mtsai., 1994). Túltermeltetése *Arabidopsis* esetében számos olyan gén expressziójának megemelkedését vonja maga után, amelyek a mag érési fázisában végbemenő folyamatokban játszanak fontos szerepet, mint a fehérje és lipid felhalmozódás, a kiszáradás elleni tolerancia létrehozása és a magnyugalom megteremtése (Lotan és mtsai., 1998). Nemcsak a mag érése során rendelkezik fontos szabályozó szereppel, hanem a morfogenezis alatt is. Már 24 órával a megtermékenyítést követően kifejeződik, ami jelzi, hogy már a magfejlődés nagyon korai szakaszában szabályozó szereppel bír (Lotan és mtsai., 1998). Szükséges az embrionális szuszpenzor létrehozásához a korai magfejlődés alatt (Lotan és mtsai., 1998), valamint fontos szerepe van a sziklevel identitás kialakításában az embriófejlődés során (Meinke és mtsai., 1992; Meinke és mtsai., 1994; West és mtsai., 1994). A *lec1* mutáns embrió sziklevelei a valódi levelekre jellemző tulajdonságokkal rendelkeznek, mint például a levélszőrök megjelenése a sziklevelek adaxiális (felső) felszínén (Meinke és mtsai., 1994; West és mtsai., 1994). Ezen kívül számos olyan gén expresszióját szabályozza, amely az embrió morfogenezisének szabályozásában vesz részt, többek között PHAVOLUTA (PHV) és a SCR TF-okét, valamint számos az auxin bioszintézisben részt vevő gén expresszióját (Junker és mtsai., 2012; Pelletier és mtsai., 2017; Hu és mtsai., 2018). Kimutatták, hogy képes indukálni a szomatikus embriófejlődést számos növény vegetatív szöveteiben, amely rendkívül jól megmutatja milyen jelentőséggel bír az embrió morfogenezise során (Lotan és mtsai., 1998; Lowe és mtsai., 2003; Yang és Zhang 2010; Ledwon és Gaj 2011; Guo és mtsai., 2013; Nic-Can és mtsai., 2013; Orlowska és mtsai., 2017). *Arabidopsis*-ban részt vesz a kloroplasztizok létrehozásában (Meinke és mtsai., 1992; West és mtsai., 1994; Junker és mtsai., 2012; Pelletier és mtsai., 2017) és az endospermium fejlődésének szabályozásában (Meinke és mtsai., 1992; Meinke és mtsai., 1994; Lotan és mtsai., 1998). Aktivitását a magfejlődés során különböző hormonok szabályozzák, mint a GA3 és az ABA (Hu és mtsai., 2018; Yamamoto és mtsai., 2009; Mendes és mtsai., 2013). A LEC1 transzkripciós faktor működésének leállítását a csíranövény fejlődése során egyrészt a PKL végzi a Hiszton H3 kromatin alkotó fehérje 27-es lizin aminosav hármass metilációján (H3K27me3), egy epigenetikai módosításon keresztül, másrészt a VAL B3 típusú fehérjék, amelyek a HDA 19-el és 6-al együttműködve végzik el feladatukat a csírázást követően (Dean Rider és mtsai., 2003; Li és mtsai., 2005; Suzuki és mtsai., 2007; Jia és mtsai., 2014).

## 2.4. Az ABI3-FUS3-LEC2 (AFL) B3 transzkripciós faktor család jellemzése

Az AFL B3 transzkripciós faktor család tagjainak feladata az embrió érési program aktiválása és a magnyugalom kialakítása. Az AFL három rokon génből áll, amelyek a LEAFY COTYLEDON2 (LEC2), FUSCA3 (FUS3) és az ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3 (ABI3) transzkripciós faktorokat kódolják (Gutierrez és mtsai., 2007; McCarty és mtsai., 1995), és melyek a magspecifikus génexpresszióban szerepet játszó RY/Sph szekvencia motívumot ismerik fel (Mönke és mtsai., 2004; Braybrook és mtsai., 2006). Mindhárom transzkripciós faktor az embriógenézis során fejeződik ki, de expressziójuk időbeli eltérést mutat (4. ábra). A *LEC2* expressziójának csúcsa megelőzi a *FUS3* és az *ABI3* expressziójának maximumát (Stone és mtsai., 2001; Kroj és mtsai., 2003), és míg az *ABI3* expressziója viszonylag magas szinten marad az embriófejlődés érési fázisában, (Parcy és mtsai., 1994) addig a *FUS3* expressziója már a mag érése előtt lecsökken (Kroj és mtsai., 2003; Laursen és mtsai., 1998). Térbeli expressziós mintázatuk is különbözik. A *LEC2* elsősorban az embrió tengelyében expresszál (Kroj és mtsai., 2003; To és mtsai., 2006), a *FUS3* az embrió protodermájában (Tsuchiya és mtsai., 2004), az *ABI3* pedig széleskörűen megtalálható az embrionális szövetekben (Parcy és mtsai., 1994; To és mtsai., 2006). Az AFL B3 transzkripciós faktorok működésének leállítását a szintén B3 típusú VAL fehérjék végzik, amelyek leállítják az AFL hálózatot a csírázás előtt (Suzuki és mtsai., 2007). Ezeknek a B3 típusú transzkripciós faktoroknak a működése szabályozza az átmenetet a mag és a vegetatív fejlődési állapot között (Zhang és mtsai., 2007).

## Arabidopsis thaliana



### 4. ábra: Az ABI/LEC2/FUS3 transzkripciós faktorok által irányított a magfejlődésben részt vevő Arabidopsis gének transzkripcionális szabályozásának modellje.

Az embriógenézis során a LEC2 TF indukálja a *YUCCA2* és *YUCCA4* gének (*YUC2/4*) kifejeződését, amely auxin választ közvetít. A *YUC2/4* gének monooxigenázokat kódolnak és a fejlődő embrióban korai sejt differenciációhoz vezetnek. Szintén az embriógenézis során a FUS3 és LEC2 TF-ok transzkripcionálisan gátolják a *Gibberellin3-oxidase2* gén kifejeződését, amely egy az aktív gibberellinek bioszintéziséért felelős enzimet kódol. Az embriógenézis és a mag érése során a FUS3 TF gátolja a *Testa Glabral* (*TTG1*) TF-t, a TTG1 TF a mag olaj tartalékainak felhalmozódását gátolja. A Transparent Testa 2 (TT2) TF, amely a proantocianidinek bioszintézisét szabályozza a magköpenyben, közvetlenül kötődik a *FUS3* gén promóteréhez. A mag érési fázisa során a LEC2 TF aktiválja az *ABI3* és *FUS3* géneket, az általuk kódolt TF-ok szükségesek a mag tartalék fehérjéinek (Seed Storage Proteins, SSP) és lipidek felhalmozódásához. A LEC2 TF transzkripcionálisan szabályozza a *WR* TF kifejeződését, amely a mag érése során a zsírsavbioszintézist aktiválja. A késői magérés során a FUS3 és ABI3 TF-ok szabályozzák a kiszáradás tolerálásában szerepet játszó gének kifejeződését, amelyek LEA és hőszokk (Heat Shock Proteins, HSP) fehérjéket kódolnak. A magnyugalmi állapot megteremtésében az auxinnak is szerepe van, ami az Auxin Response Factor 10 (ARF10) által indukálja az *ABI3* gént. A mag hosszú élettartamának fenttartásában két mag specifikus vakuoláris aquaporin gén, a *Tonoplast Intrinsic Proteins 3-1 és 3-2* (*TIP3-1*; *TIP3-2*) vesz részt, amelyek expresszióját az ABI3 TF szabályozza. Az ABI3 TF kölcsönhat az ABI5 és DELLA fehérjékkel vagy a PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR-LIKE 5-el (PIL5) és aktiválja a *SOMNUS* (*SOM*) gén kifejeződését, amely az ABA szintézisben és a GA katabolizmusban részt vevő gének kifejeződését szabályozza, ezáltal gátolja a mag csírázását (Carbonero és mtsai., 2017 munkája alapján).

## 2.5. A LEAFY COTYLEDON 2 (LEC2) transzkripciós faktor jellemzése

A LEC2 TF szerkezetét tekintve a növényi TF-ok AFL B3 családjába (Stone és mtsai., 2001), míg funkcióját tekintve a LEC TF-ok közé tartozik (Meinke és mtsai., 1994). Feladata az embrió fejlődési program szabályozása. Az embriófejlődés során részt vesz az embrió morfogenezisének, és érési szakaszának irányításában (Harada és mtsai., 2001). Az embriógenézis során részt vesz a szuszpenzor sejtsors specifikációban és a sziklevel identitás létrehozásában. Az érési fázisban pedig segíti a deszikkációs tolerancia kialakulását és aktiválja számos érési specifikus gén kifejeződését (Meinke és mtsai., 1992, 1994; Harada, 2001; Stone és mtsai., 2001), valamint gátolja a magvak idő előtti csírázását (Harada és mtsai., 1997).

A LEC TF-ok (LEC1, LEC2, FUS3) mutációi hasonló hatásúak. Hiányuk megakadályozza a normális magérést és nedves környezetben az embrió korai csírázását eredményezi. Megváltozik a tartaléktápanyagok és az antocianin felhalmozódása, a sziklevelek levéljellegeket vesznek fel, levél szőrök ún. trichómák képződnek rajtuk. Jellemző rájuk a korai hajtás és gyökérmerisztémanövekedés, a deszikkációs intolerancia és a rövidebb nyugalmi állapot (Meinke és mtsai., 1992, 1994). A *lec2* mutáns 1994-ben Meinke és mtsai. azonosították és jellemezték. A LEC TF-ok mutánsainál látottakhoz képest kismértékben eltérő fenotípusos jellegeket tapasztaltak. A *lec2* mutáns magjai bizonyos mértékben tolerálják a kiszáradást, habár a magok életképessége romlik néhány hét tárolás után. Az ezekből fejlődő csíranövények szabálytalan formájú sziklevelekkel rendelkeznek, mivel kiszáradás hatására a magok csúcsi része és a sziklevelek disztális vége még a csírázás előtt sérül. Emiatt a sziklevelek disztális csúcsán keményítő, a bazális régióban pedig abnormális fehérje felhalmozódás jön létre. Az embrionális szár és a sziklevel más részei nem károsodnak. A száraz magokból csírázott növények sziklevelén nincs trichóma, a trichómákkal rendelkezők nem tolerálják a kiszáradást. A mutánsok érett magjaira jellemző az erős pigmentáltság, a csíranövények sziklevelének felső részére pedig az antocianin felhalmozódás.

A *LEC2* gén az erős 35S promóter (karfiolmozaik vírus 35S RNS génjének promótere) szabályozása alatt történő túltermelésével *Arabidopsis thaliana* növényekben szomatikus embriógenézis kialakulásához vezet az embrionális útvonalak aktivációja által. Embriószerű struktúrák jelennek meg a fiatal csíranövények sziklevelén. Jellemző rájuk a frissnek tűnő, szét nem terülő sziklevel és a rövid, meg nem nyúlt embrionális szár és gyökér. Ezek a tulajdonságok arra utalnak, hogy a LEC2 TF túltermelése meghosszabbítja az embrionális fejlődés időszakát. A szomatikus növényi sejteknek általában valamilyen külső ingerre van szükségük ahhoz, hogy a szomatikus embriógenézisre alkalmassá váljanak. Ez bizonyos növényi hormonok adásával

lehetséges, mint az auxin vagy a citokinin. A *LEC2* gén túltermeltetése esetén a szomatikus sejtek hormonkezelés nélkül is alkalmassá válnak az embriógenézisre, ami arra utal, hogy a *LEC2* TF szerepet játszik a szomatikus embriógenézisben részt vevő gének aktivációjának kiváltásában (Stone és mtsai., 2001). A *LEC2* TF túltermeltetése például megnöveli az auxin bioszintézisét, közvetlen célgénjén a *YUC4*-en keresztül (Stone és mtsai., 2008).

A *LEC2* a *FUS3* TF-ral együtt pozitívan szabályozza az ABA és negatívan a *GA3* bioszintézisét. Számos, a hormon bioszintézisben és lebontásban részt vevő kulcsfontosságú enzimet kódoló gént ellenőriznek, mint a 9-cisz-epoxikarotin dioxigenáz, az ABA-8'-hidroxiláz és a *GA3*-oxidáz. Következésképpen a *lec2* és *fus3* mutánsokban az ABA/*GA3* arány alacsonyabb a WT-hoz képest, ez pedig összhangban van a mag érésében okozott defektusokkal, és a korai csírázással (Gazzarini és mtsai., 2004; Curaba és mtsai., 2004; Nambara és mtsai., 2000).

## 2.6. A WRINKLED 1 (WRI1) transzkripció faktor jellemzése

A *WRI1* TF az APETALA2/ETHYLENE-RESPONSIVE ELEMENT BINDING PROTEIN (AP2/EREBP) család tagja (Cernac és mtsai., 2004). A zsírsavbioszintézis első pozitív szabályozója, amelyet növényekben azonosítottak (Cernac és mtsai., 2004). *Arabidopsis thaliana*-ban elsősorban az érő magvak olajakkumulációjában és a normál embriófejlődésben játszik szerepet (Baud és mtsai., 2007). A zsírsavtermelésben szerepet játszó gének egyidejű expresszióját eredményezi a magérési szakasz kezdetén. (Cernac és mtsai., 2004). Nevét az *Arabidopsis thaliana*-ban végzett kísérletek során kapta, megfigyelték, hogy *wri1* mutánsa „ráncos” (angolul: wrinkled) külsejű maghéjjal rendelkezik (Focks és mtsai., 1998). Célgénjei közé késői glikolitikus és zsírsav bioszintézis gének tartoznak, mint a piruvát kináz, a piruvát dehidrogenáz, acetyl CoA karboxiláz BCCP2 alegysége az enoil-ACP reduktáz, a foszfogliceráz mutáz, valamint a liponsav és a biotin bioszintézis utolsó lépését katalizáló LAS és BIO2. (Baud és mtsai., 2007). Célgénjeinek promóter régiójában konzervált, a *WRI1* által felismerhető nukleotid szekvencia (CnTnG(n)7CG) ún. AW-box található (Maeo és mtsai., 2009).

Mutánsát, a *wri1-1*-et 1998-ban Focks és mtsai. izolálták és tanulmányozták. Pontmutáció található a *WRI1* gén első intronjában, aminek következtében rendellenes *WRI* transzkriptum halmozódik fel az érésnek induló *wri1-1* magokban. A *wri1-1* mutánsban a zsírsavbioszintézis transzkripcionális aktivációjának hiánya az érésnek induló embrió triglicerid (TAG) bioszintézisének hibás működését eredményezi, melynek következményeképpen raktározott

olajokban szegény, kicsi, ráncos magok keletkeznek. A mutáns magok TAG tartalma 80 %-kal csökken, mivel a *WRI1* transzkripció faktor hiányában a fejlődő magok a környezetükben jelenlevő szacharózt és glükózt képtelenek átalakítani a zsírsav bioszintézis prekursoraivá, valamint számos glikolitikus enzimnek csökken az aktivitása (Focks és mtsai., 1998). A *wri1-1* mutáns magokra jellemző a rossz, cukorkezelés hatására sem javuló csírázási hatékonyság (50 %-os), valamint az, hogy *in vitro* cukor nélkül a *wri1-1* magokból létrejövő csíranövények nem fejlődnek tovább (ez az ún. seedling establishment fenotípus) csak akkor, ha cukor tartalmú táptalajra helyezik át őket (Cernac és mtsai., 2006). A mutáns csíranövények embrionális szára sötétben nem tud megnyúlni, és cukorkezelés hatására is csak kis mértékben javul az embrionális szár megnyúlása (Cernac és mtsai., 2006). Mindazonáltal a mutáns vegetatív fejlődése és a virágzás megfelelő körülmények között végbemehet, mivel képes a késői glikolízisben és a zsírsavbioszintézisben részt vevő génjeinek alapszintű expresszióját fenntartani (Baud és mtsai., 2009).

A *wri1-1* mutáns fenotípusát nem csak az *Arabidopsis thaliana* *WRI1* génjének visszajuttatásával, hanem más fajokból származó, mint például a repceből, az olajpálmából és a kukoricából származó *WRI1* génnel is komplementálni tudták (Liu és mtsai., 2010; Ma és mtsai., 2013; Pouvreau és mtsai., 2011). 2013-ban Wei Ma és munkatársai kutatásaik során feltárták, hogyan lehetséges az *Arabidopsis wri1-1* mutáns komplementálása a különböző növényfajokból származó *WRI* transzkripció faktorral. Találtak egy konzervált 9 bázispáros exont, ami a „VYL” aminosavat kódolja. Ennek a három aminosavnak esszenciális szerepe van a normál zsírsavtartalom kialakításában, ami alapján esszenciális komponense a *WRI1* felépítésének. Sőt, a mutáns komplementálása sikeres volt az *Arabidopsis thaliana*-ból származó, de más funkciót betöltő *WRI3* és *WRI4* génekkel is, kivételt csak a *WRI2* gén képez, amely nem ismeri fel a többi *WRI* TF által felismert cisz-szabályozó elemet, az ún. AW-boxot (To és mtsai., 2012).

A *WRI1* gén 35S promóter szabályozása alatt történő túltermelés Arabidopsisban a magok olajtartalmának növekedését eredményezte. Hatására cukor tartalmú MS (Murashige and Skoog medium) táptalajon nemcsak a magok, hanem a fejlődő csíranövények is TAG-ot halmoznak fel. Ezek a csíranövények nem zöldülnek be, a sziklevelek és gyakran a csúcsi kampó sem nyílik ki, az embrionális szár pedig megnyúlik. A cukor-függő úton létrejövő fejlődési rendellenességek megjelenése az olajat felhalmozó, fejlődő magvak egyfajta meghosszabított vagy újraindított embrionális állapotának a következménye (Cernac és mtsai., 2004).

A *WRI1* gén mRNS-e nagy mennyiségben halmozódik fel a fejlődő *Arabidopsis* magokban, míg a vegetatív szervekben, mint amilyen a levél csak kis mennyiségben található meg (Cernac és Benning, 2004). A becőn belül kifejeződik az embrióban és az



endospermiumban, míg a magköpenyben és az anyai szövetekben nem, így a becő falában sem található meg. A becőfejlődés kezdetén a géntermék mennyisége alacsony szintű. Felhalmózódása a magokban 7-8 nappal a beporzás után kezdődik meg, csúcspontját pedig 8-10 nappal a beporzás után éri el. Ekkor indul el a mag érése, amelynek során folyamatosan csökken a géntermék mennyisége. A WRI1 transzkripciós faktor kifejeződésének és a raktározott olajok keletkezésének helye között térbeli kapcsolatot találtak, a WRI1 megfelelő expresziós mintázata szükséges a magok optimális olajfelhalmózódásához (Baud és mtsai., 2007).

### **3. A növényi sejtosztódás jellemzése**

A sejtosztódáson alapszik az élet megújulási képessége, minden sejt kizárólag már meglévő sejtek osztódásával jön létre. Osztódás előtt a sejtek megkettőzik anyagaikat, majd két, a kiindulási anyasejttel és egymással teljesen egyforma leánysejtet hoznak létre. Ezt a minden élőlényre alapvetően jellemző folyamatot, melynek során a növekedés és a sejtosztódás ciklikusan váltakozik, sejtciklusnak nevezzük. A sejtciklus egyirányú, vissza nem fordítható ún. irreverzibilis folyamat, ahol az egymást követő fázisok nem cserélhetők fel egymással. Két egymást követő folyamatra osztható a sejtciklus: időben az első az S vagy szintetikus fázis, melynek során, egyszer megduplázódik a sejtek DNS tartalma (DNS replikációs szakasz). Ezt követi a második fő folyamat, az M vagy mitózis fázisa, melynek során végbemegy a megkettőződött kromoszómák szétválasztása és az utódsejtekbe egyenlő számban történő szétosztása, a kromoszómák szegregációja. Ezeket a fázisokat az úgynevezett gap (magyarul rés, röviden G) fázisok választják el, ahol a sejtek felkészülnek a következő lépésre és ahol a folyamatok ellenőrzése is megtörténik. A mitóziست követő szakaszt G1-nek, az S fázist követőt pedig G2-nek nevezzük. Amennyiben a környezeti feltételek, vagy a tápanyag ellátottság nem megfelelő, illetve ha beindul a differenciálódási program a sejt a G1 fázisból átlép a nyugalmi G0 fázisba, vagyis kilép a sejtciklusból. A sejtciklus részleteiben eltérhet a különböző organizmusokban, növényekben például nincsen centroszóma, amely a többi eukariótában a kromoszómák szétválasztását irányítja. A sejtosztódás molekuláris szabályozásáról kimutatták, hogy a különböző eukarióta organizmusokban a gombáktól kezdve az emlősök és a magasabbrendű növényekig bezárólag nagyon hasonló folyamatok és szabályozó molekulák vesznek részt. Ezért a felfedezésért Leland H. Hartwell, R. Timothy Hunt és Paul M. Nurse 2001-ben Nobel díjjal lett jutalmazva (The Official Web Site of the Nobel Prize, The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2001). A sejtciklus központi szabályozója egy protein kináz,

amelynek a működése elsősorban a ciklin molekuláktól függ (a sejtciklus során periodikusan megjelenő fehérjék), így a neve CIKLIN-FÜGGŐ KINÁZ (angol nevén CYCLIN-DEPENDENT KINASE röviden és a későbbiekben, mint CDK). A CDK egy Szerin/Threonin specifikus kináz, amely a sejtciklus szabályozó fehérjék foszforilációja révén irányítja a sejtosztódás folyamatát. A későbbi vizsgálatok kimutatták, hogy a CDK enzimek működése elsősorban fehérje szinten, ún. poszt-transzlációs változásokon keresztül szabályozódik (úgy mint, foszforiláció, ciklin lebontási folyamatok által, CDK-gátló fehérjék kötődése révén – Morgan D.O., 2007). Az élesztő fajokban csak egyetlen CDK vesz részt a sejtosztódás szabályozásában (Cdc2 a hasadó, és CDC28 a sarjadó élesztőben, más fajokban ez lett a CDK1), míg az állatokban több CDK fehérjét is azonosítottak sejtciklus szabályozási szereppel. Az állati CDK molekulák közül a CDK1 képes helyettesíteni az élesztő *cdc2/CDC28* mutánsokat. A többi CDK erre már nem képes, és az állati CDK-ák többsége a sejtciklus interfázisában, ott is elsősorban a G1-S tranzíció során, az osztódásba lépésnél (CDK4/6), valamint az S-fázisban (CDK2) játszanak szabályozó szerepet. A CDK1 kettős szereppel bír, szabályozza az osztódásba és az M-fázisba történő lépést is.

A növényekben az állatokhoz hasonlóan több tagból álló CDK család létezését mutatták ki (Magyar és mtsai., 1997). A CDK géncsaládnak *Arabidopsis thaliana*-ban 12 tagját azonosították, melyeket 8 csoportba soroltak, CDKA-F (Vandepoele és mtsai., 2002), míg a szabályozó Ciklin családnak 30 tagját azonosították. Az eukarióta CDK1 növényi megfelelője a CDKA, melynek *Arabidopsis*-ban egyetlen tagja van, a CDKA;1, mellette a növény-specifikus CDKB alcsalád tagjai vesznek részt közvetlenül a sejtciklus szabályozásában (De Veylder és mtsai., 2007). Ezek a CDK enzimek A, B és D-típusú ciklinekkel képeznek komplexeket. A ciklin alegységek fázis specifikusan jelennek meg a sejtciklus során, kifejeződésüket hormonok és a fejlődési program szabályozza (Menges és mtsai., 2003). A CDK-ák aktivitását nem csak a ciklinek, hanem más szabályozó fehérjék is képesek befolyásolni. Ilyenek a CYCLIN-DEPENDENT KINASE INHIBITOR-ok (CKI), növényekben a KIP-állati gátlófehérjékkel távoli rokonságot mutató KIP-RELATED PROTEIN (KRP), valamint a növény specifikus SIAMESE inhibitor fehérjék (SIM; De Veylder és mtsai., 2007). Ezen kívül további kinázok (WEE1 kináz) és foszfatázok (CDC25 foszfatáz) szabályozzák a CDK működését foszforiláció és defoszforiláció révén. A WEE1 kináz és a CDC25 foszfatáz a CDK1 fehérjében található úgynevezett gátló 14-15-ös pozíciójú Threonin (T) és Tyrozin (Y) aminosavak foszforiláltsági állapotáért felelősek. A növényi CDKA;1 fehérjében is konzerválódtak ezek a gátló foszforiláltsági helyek. Növényi homológja a CDC25 foszfatáznak ugyanakkor nincs, egyetlen CDC25-szerű fehérjét azonosítottak *Arabidopsis*-ban, amelyben hiányzik az N-terminális

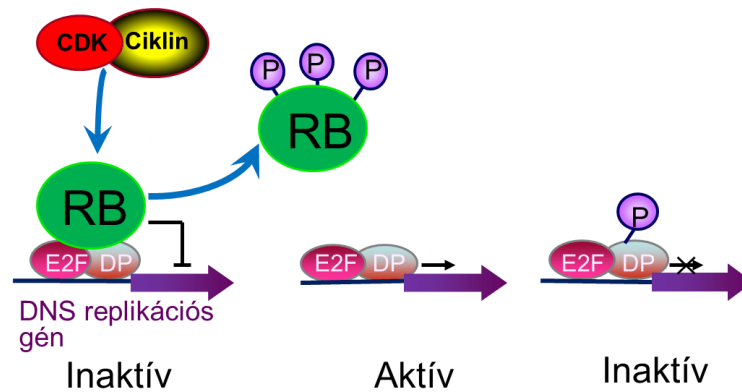
szabályozó domén (Dewitte és Murray 2003; Landrieu és mtsai., 2004; Inze és De Veylder 2006). Növényi, köztük Arabidopsis WEE1 kináz homológot ugyanakkor azonosítottak, ami a hasadó élesztőben túltermeltetve gátolta a sejtosztódást (De Schutter és mtsai., 2007). A további vizsgálatok alapján azonban kimutatták, hogy a WEE1 kináz nem a növényi sejtciklus általános szabályozásában, hanem a DNS replikációs stresszválasz kialakításában vesz részt (De Schutter és mtsai., 2007).

A sejtciklus három fő ellenőrző ponttal rendelkezik. Az első a G1/S fázisátmenetnél található, melyen akkor halad tovább a sejt, ha készen áll a DNS a replikációra, nincs DNS sérülés, megfelelő sejtmérettel rendelkezik és nincs tápanyaghiány. A második ellenőrzőpont a G2/M átmenetnél található. Itt ellenőrzi a sejt, hogy sikeresen, hibátlanul befejeződött-e a genetikai információ megkettőződése, és kijavítottak az esetleges hibák. Az utolsó ellenőrzőpont pedig az M/G1 átmenetnél van, melyben megvizsgálja a sejt, hogy a kromoszómák készen állnak-e a szétválásra. A három ellenőrzőpontban feltételezhetően különböző CDK-Ciklin komplexek a szabályozók. Hogyan működnek ezek a szabályozók, és hogyan biztosítják a sejtciklus működését? Az élesztőben egyetlen CDK különböző fázisokban expresszáldó Ciklin fehérjékkel lép komplexbe. Ez alapján feltételezték, hogy a különböző sejtciklus fázisokban formálódó CDK-Ciklin komplexek más és más szabályozó fehérjét kontrollálhatnak és ez a mechanizmus biztosítja a sejtciklus folyamatait és a fázisok sorrendjét (ez az ún. kvalitatív vagy minőségi modell). A későbbi vizsgálatok azonban kimutatták, hogy az élesztő összes ciklin és Cdc2 génjére mutáns élesztővonalban elegendő volt egyetlen mesterségesen előállított CDK-Ciklin kiméra fehérje a sejtciklus normális lefolyásához (Cdc13-Cdc2; Coudreuse és Nurse 2010). Igazolták azt is, hogy az élesztő sejtciklus előrehaladása során a CDK aktivitása fokozatosan emelkedik; az osztódásba lépéshez még alacsony kináz aktivitásra van szükség, míg az M-fázisba lépéshez már csak magas kináz aktivitással lehet belépni. A CDK aktivitás mesterséges megváltoztatásával „sikerült” elrontani a fázisok sorrendjét. Mindezek alapján a sejtciklus a CDK kináz aktivitási értékek mentén szabályozódik (ez az ún. kvantitatív vagy mennyiségi modell). A magasabbrendű állatokban azonban nem csak Ciklin molekulából, de CDK-ból is több van, amelyek sejtciklus fázis specifikusan jelennek meg és ezek a CDK-ák egymás után, mintegy szekvenciálisan fázisról fázisra aktiválódnak. Mutáns modell állatok segítségével igazolták, hogy a sejtosztódás szabályozásához itt is elegendő egyetlen CDK, és ez az élesztő Cdc2/CDC28 állati megfelelője, a CDK1 (Santamaria és mtsai., 2007). A CDK1 hiányában nagyon korai stádiumban leáll az embrionális fejlődés, mert a sejtek nem képesek tovább osztódni, ami egyértelműen igazolta, hogy az interfázisú CDK enzimek nem képesek helyettesíteni a CDK1 funkcióját. Kimutatták, hogy a CDK1 az interfázisú CDK-ák hiányában

(CDK2,4 és 6) képes komplexbe lépni az összes Ciklin fehérjével (E-D-A-B típusúakkal). Hasonlóképpen a CiklinD és CiklinE mutáns egér embriók is fejlődő képeseknek bizonyultak, míg CiklinA és Ciklin B (a mitotikus Ciklinek) mutánsok osztódása és így fejlődése is sérült (Sherr és Roberts 2004; Murphy és mtsai., 1997; Brandeis és mtsai., 1998). Érdekes módon a növényi CDK1, a CDKA;1-re mutáns Arabidopsis embrió életképesnek bizonyult, bár lényegesen kevesebb sejtet tartalmazott, mint a vad típusú kontroll embrió (összesen 10 % -nyi sejtből állt – Nowack és mtsai., 2012). Ez arra enged következtetni, hogy a növényi interfázisú B-típusú CDK-ák nem tökéletesen, de valamennyire képesek pótolni a CDKA;1 funkcióját.

A sejtciklus folyamatának szabályos megvalósulásához nemcsak a CDK-ák megfelelő időben történő aktivációja szükséges, hanem fontos szerepe van az aktivitásukat szabályozó fehérjék (például a Ciklin és a CDK gátló fehérjék) lebontásának is, amikor azokra már nincs szükség. A mitotikus ciklinek lebontása szükséges ahhoz, hogy a sejtek a mitózisból ki tudjanak lépni, és ebben meghatározó szerepet játszik az ANAPHASE-PROMOTING COMPLEX/CYCLOSOME (APC/C), ami egy ubiquitin–ligáz komplex. A DNS replikáció szintén fehérjelebontás által szabályozott folyamat. A sejtciklus szabályozásban részt vevő ubiquitin–függő fehérjelebontó rendszeren belül két E3 ubiquitin–ligáz enzimkomplexet azonosítottak. Az egyik a SKIP-CULLIN F-BOX (SCF), amely a G1/S és az S/G2 fázisátmenetekben szabályoz, a másik pedig a mitózisból való kilépést szabályozó APC/C (Peters, 1998; Reed, 2003).

Hogyan kapcsolódnak be a sejtosztódási gének, mi szabályozza a koordinált működésüket a sejtciklus alatt és a fejlődő növényben? A jelenleg elfogadott modell szerint egy az evolúció során konzerválódott transzkripcionális mechanizmus irányítja az osztódásba történő be- és kilépést, melyet a benne résztvevő szabályozó elemekről E2F-RB-nek neveztek el (Magyar és mtsai., 2008). A *RETINOBLASZTÓMA (RB)* az első tumorszupresszor gén volt, amelyet emlős sejtekből izoláltak, míg az E2F (ADENO VIRUS E2 FAKTOR) TF-t az RB-vel komplexet formáló képessége alapján azonosították (van den Heuvel és Dyson, 2008). A növények és az állatok közti alapvető életmódbeli különbségek ellenére ez a molekuláris szabályozási folyamat meglepően jól konzerválódott a növényekben is (Inze and De Veylder, 2006).



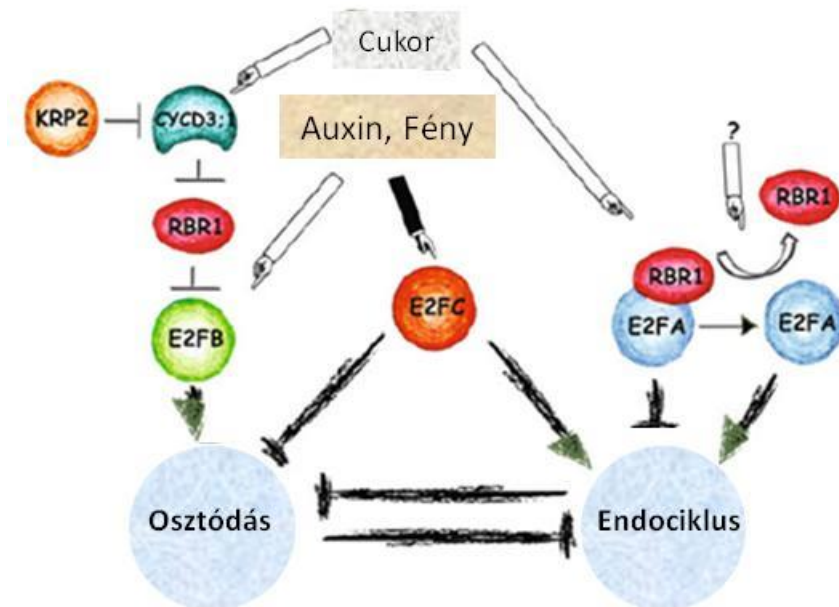
### 5. ábra: A klasszikus E2F-RB transzkripcionális szabályozási modell.

Az aktív, alul foszforilált RB, a nem osztódó sejtekben az E2F TF-ok transz-aktivációs doménjében található RB-kötő régióhoz kötődik, amivel megakadályozza az osztódásba lépést és az S-fázisú gének aktiválódását. Mitogén stimulus hatására (állatok esetében elsősorban növekedési faktorok) RB-kinázok aktiválódnak (többnyire CDK-Ciklin enzimek), melyek az RB fehérjét több helyen is foszforilálják (hiperfoszforiláció). A felül foszforilált RB fehérje konformációja megváltozik, és szabadon engedi az E2F/DP heterodimerikus transzkripció faktort, amely aktiválja az S-fázisú géneket. A késői S-fázis alatt az E2F/DP foszforilálódás által elveszíti DNS-kötő képességét, és az S-fázisú gének kikapcsolódnak (Nakagami és mtsai., 2002, illetve Espinosa-Ruiz és mtsai., 2004 munkája alapján).

### 3.1. Az Arabidopsis E2F-RBR modell

Az E2F-RB szabályozási mechanizmus meglehetősen jól konzerválódott a növényekben. Az állati *E2F* és *RB* gének homológjait nemcsak az egysejtes zöld algában (*Chlamydomonas reinhardtii*), hanem ennél magasabb szerveződési szintű növényekben is megtalálták, mint például a növénybiológiai alap kutatások modellnövényében az *Arabidopsis thaliana*-ban (Inze és De Veylder, 2006). Az Arabidopsisban egyetlen RB rokon fehérjét találtak (RBR), amely az állati RB fehérjéhez hasonlóan meghatározó szerepet játszik az osztódás és a differenciálódás, valamint a sejthalál (apoptózis) szabályozásában, az őssejt állapot fenntartásában, de az ivarsejtek képződésében és a meiózisban is (Ebel és mtsai., 2004; Park és mtsai., 2005; Desvoyes és mtsai., 2006; Chen és mtsai., 2009, 2011; Wildwater és mtsai., 2005; Kobayashi és mtsai., 2015; Horváth és mtsai., 2017). Az RBR fehérje három E2F transzkripció faktorról képes komplexet alkotni (E2FA, E2FB és E2FC–Magyar és mtsai., 2005; 2012; del Pozo és mtsai., 2002). Az RBR funkciójáról ezek alapján megállapítható, hogy eszenciális a növény fejlődéséhez. Nem minden folyamatban ismert azonban, hol szabályoz együtt az E2F transzkripció faktorokkal, és hol kapcsolódik más transzkripció faktorokhoz. A levél zárósejt

vonala fejlődésében például kimutatták, hogy az RBR kölcsönhat a FAMA transzkripciós faktorról (basic helix-loop-helix fehérje), amely a zárósejtek differenciálódásáért felelős. Az RBR-FAMA kölcsönhatás gátlásával a differenciált zárósejtekben újra indul a zárósejt képződés, megszűnik a terminális differenciált állapot (Matos és mtsai., 2014). A gyökérben az RBR a SCR transzkripciós faktorról komplexben szabályozza az aszimmetrikus sejtosztódást (Cruz-Ramirez és mtsai., 2012). Az eddigi adatok alapján a három E2F transzkripciós faktor egymással átfedő és eltérő funkcióval is rendelkezik, de a DNS kötéshez mindegyikük heterodimer komplexet hoz létre a dimerizációs partner fehérjék valamelyikével, DIMERIZATION PARTNER PROTEIN A és B (DPA és DPB; Inze és De Veylder, 2006; Magyar, 2008). Az Arabidopsis gének 25 %-a tartalmaz E2F-kötő elemet a promóter szabályozó régiójában, ami azt mutatja, hogy az E2F-ek alapvető szerepet játszanak a növényi fejlődés szabályozásában, és feltehetően nemcsak a sejtosztódás és a differenciálódás irányításában vesznek részt (Vandepoele és mtsai., 2005, 2009). Eddigi ismeretünk szerint az E2F-RB szabályozás növények esetében elsősorban a sejtosztódási gének be és kikapcsolásában vesz részt, ám az alábbi vizsgálataink eredményei alapján feltételezhetően nem csak a sejtciklus irányításában részt vevő géneket szabályozhatnak, hanem részt vesznek egyéb folyamatok, mint a mag érésének irányításában is.



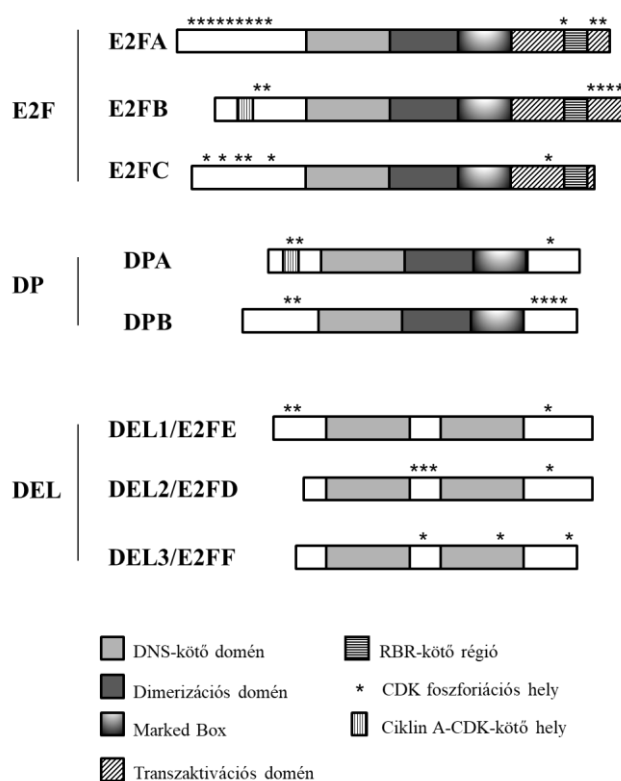
### 6. ábra: A növényi E2F-RBR szabályozási modell.

A növényi RBR gén és fehérje aktivitását, foszforiláltsági állapotát a növényi hormonok mellett, mint amilyen az auxin is, külső környezeti faktorok is jelentősen befolyásolhatják; ezek közül is meghatározó a fény jelenléte, ami nélkül a növény nem képes fotoasszimilátumot, szénhidrátot létrehozni (cukor). A cukor jelenléte stimulálja a CYCD3;1 (D-típusú Ciklin) kifejeződését, amely aktiválja a CDKA;1 kinázt és foszforilálja az RBR-t. Az E2FB felszabadul az RBR gátlás alól, amely bekapcsolja a sejtosztódáshoz szükséges gének kifejeződését és elindul a sejtosztódás. Cukor hiányában a CDK inhibitor fehérjék egyike, a KRP2 (hét tagú család egyik tagja, KRP1-7) gátolja a CDKA;1 aktivitását, és az alul foszforilált RBR képes komplexet formálni a sejtciklus aktivátor E2FB-vel. Az E2FC a sejtciklus represszora, amely gátolja az osztódásba lépést fény hiányában. Az E2FB és E2FC fehérjeszintek ellentétesen szabályozódnak az auxin és a fény jelenlétében (del Potro és mtsai., 2002; Lopez és mtsai., 2007). Az E2FA szemben az E2FB-vel cukor jelenlétében is komplexbe lép az RBR-vel. Ez a komplex gátolja az endociklust bekapcsoló géneket, ezáltal a differenciálódási programot is. Egy még ismeretlen folyamat által ez a komplex szétesik, és a szabad, RBR nélküli E2FA aktiválja az endociklust. A nyíl és a kalapács a molekuláris szabályozást jelzi: a nyíl az aktivációt, a kalapács a repressziót. A fehér és a fekete kar a hormonhatást és a külső környezeti faktorok hatását jelzi: a fehér kar a stimuláló, a fekete kar a gátló szignálokat (az ábrát Magyar és mtsai., 2012 munkája alapján készítettük).

## 3.2. Az E2F transzkripció faktorok jellemzése

2002-ben Vandepoele és mtsai. *Arabidopsis thaliana*-ban az E2F családnak 6 tagját írták le. Ezek közül három, az E2FA, E2FB és az E2FC strukturális felépítése megegyezik az állati E2F1-5 fehérjék szerkezetével. Két, az E2F-ekkel rokon DIMERIZÁCIÓS PARTNER, DPA és DPB képes az E2FA-C faktorokkal heterodimert formálni (Magyar és mtsai., 2000). A három másik *Arabidopsis* E2F TF csak távoli rokonságban áll a többivel, ezeket DP-E2F-szerű, röviden

DEL fehérjéknek (DP-E2F-Like) DEL1, DEL2 és DEL3 nevezték el. A DEL fehérjék DNS-kötő doménje az E2F-DP faktorokhoz hasonló, de szemben velük, kettővel is rendelkeznek, míg a DP-kel nem hoznak létre heterodimert, ennélkül is képesek a DNS-hez kötődni. Funkciójuk közvetlenül nem függ az RBR fehérjétől, mivel nem rendelkeznek RB-kötő motívummal (7. ábra).



## 7. ábra: Arabidopsis E2F és DP rokon fehérjék szerkezete.

Az Arabidopsis E2FA, E2FB, és E2FC fehérjék rendelkeznek a klasszikus E2F molekulákra jellemző összes konzervált doménnel (DNS-kötő, Dimerizációs, Marked box, Transzaktivációs és RBR-kötő domén). Az Arabidopsis E2F család másik három tagja, a DEL1-3/E2FE-F fehérjék csak a konzervált DNS-kötő doménnel rendelkeznek, de ebből kettővel is, míg a többi strukturális E2F-re jellemző domén hiányzik belőlük. A DIMERIZÁCIÓS PARTNER (DPA és DPB) fehérjék szerkezete a klasszikus E2F transzkripció faktorokhoz hasonló. Csillaggal jelöltük a potenciális CDK foszforilációs helyeket (Magyar és mtsai., 2008 alapján).

Az állatoknál létrehozott rendszerhez hasonlóan a növényi E2F-ek funkcionális jellemzése alapján transzkripció aktivátor (E2FA és E2FB) illetve transzkripció represszor (E2FC) csoportokba sorolhatóak be (Magyar és mtsai., 2008). Funkcionális jellemzésük során további különbségeket találtak az egyes Arabidopsis E2F-ek között. Míg az E2FA túltermeltetése nem csak a mitotikus sejtciklus, hanem az endociklus aktivációját is eredményezte (De Veylder és mtsai., 2002; Kosugi és Ohashi, 2003), addig az E2FB esetében



csak a mitózis aktiválódott (az endociklus ugyanakkor gátolódott). Az endociklus a mitotikus sejtciklus egy módosított változata, ahol csak a DNS replikációs fázis ismétlődik, aminek következtében megnő a sejtek DNS tartalma (ploidy-szint). A növényi endociklus az M-fázisú CDKB1;1 inaktivációjával és ciklin partnerük (mitotikus CYCA2;3) lebomlásával kezdődik (Boudolf és mtsai., 2009). A ploidy-szint emelkedése a differenciált és megnyúlt növényi sejtekre jellemző. Az E2FB túltermeltetése fokozta a sejtosztódást és gátolta az endociklust mind növényi sejtekben, mind pedig transzgenikus Arabidopsis növényekben (Magyar és mtsai., 2005; Sozzani és mtsai., 2006). Az E2FC esetében pedig megállapították, hogy míg a mitózist negatívan, addig az endociklust pozitívan szabályozza (del Pozo és mtsai., 2006). Ezek alapján az E2FB és az E2FC antagonisztikus funkciójú TF-ok (6. ábra). Az E2FA pedig mind a sejtosztódást, mind az endociklust képes pozitívan szabályozni (del Pozo és mtsai., 2006; Sozzani és mtsai., 2006).

Az E2FA fehérje az E2F szabályozási hálózat egy speciális tagja. Promóterében nincs konszenzus E2F-szabályozó szekvencia elem, ezáltal működését feltételezhetően egyik E2F transzkripciós faktor sem irányítja közvetlenül, ugyanakkor ő maga szabályozza az E2FB és az E2FC rokon gének kifejeződését is (Vandepoele és mtsai., 2005). Érdekes módon, az E2FA-DPA heterodimer túltermeltetésével nemcsak a sejtosztódás, hanem az endociklus is aktiválódott, amely a differenciálódó sejtekre jellemző folyamat. Az egyik hipotézis szerint, ezekben a növényekben az E2FA túltermeltetésével az RBR nem tud lépést tartani, és az így szabaddá váló, RBR-mentes E2FA stimulálja az S-fázisba lépést (DeVeylder és mtsai., 2002). Az osztódó sejtekben az aktív E2FA további osztódásokat stimulál, mert ezek rendelkeznek a mitózist indukáló faktorról (Mitosis-Inducing Factor (MIF), az állati Mitosis-Promoting Factor (MPF) növényi megfelelője). A nem osztódó sejtekben azonban, ahol MIF már nem képződik, az E2FA csak az endociklust képes aktiválni (G1-S ciklus), aminek köszönhetően megnő a sejtek DNS tartalma (ploidy szintje). Érdekes módon azonban az endociklust egy olyan E2FA deléciós mutáns is képes volt stimulálni, amelynek hiányzott a transzaktivációs doménje (Magyar és mtsai., 2012). Kimutatták azt is, hogy az E2FA az osztódó sejtekben komplexben van az RBR-rel, és így közösen gátolhatják a mitózisba lépést megakadályozó géneket (mint például az APC aktivátorát, a *Ccs52A1-2* géneket; Magyar és mtsai., 2012). Ezt támasztotta alá, hogy az RBR fehérje kötődését ezeknek a géneknek a promóter régiójában ki lehetett mutatni (Magyar és mtsai., 2012). Az RBR funkció gátlásával spontán sejthalált lehetett megfigyelni az Arabidopsis gyökerek merisztémájában (Cruz-Ramirez és mtsai., 2013). Későbbi vizsgálatok alapján kiderítették, hogy az RBR specifikusan az E2FA-val komplexben szabályozza a sejthalál folyamatát (Horváth és mtsai., 2017).

Az E2FB TF túltermeltetése mind növényi sejt kultúrában, mind pedig növényekben a sejtosztódási gének aktiválódásához vezetett, ezért sorolták az E2FA-val együtt az aktivátor E2F-ek közé (Magyar és mtsai., 2005; Sozzani és mtsai., 2006). Az E2FB túltermeltetése növényi sejtekben (dohány Bright Yellow 2 sejtek, röviden BY-2 sejtek) a növényi növekedési hormon, az auxin hiányában is képesnek bizonyult a sejtosztódást aktiválni, ami az állati aktivátor E2F-ekhez teszi hasonlatossá (Magyar és mtsai., 2005). Az E2FB, az S-fázis specifikus E2FA-val szemben, a sejtciklus teljes hossza során kifejeződik (Magyar és mtsai., 2000; 2005). Az E2FB túltermelése az Arabidopsis sejteinek számfelletti osztódásához vezet, gátolja a sejtek megnyúlását, a növények gyökerei pedig rövidebbek lettek a kontroll vad típusú gyökerekhez viszonyítva (Sozzani és mtsai., 2006). Érdekes módon az Arabidopsis E2FB paradicsomban történő túltermeltetése korai virágzáshoz vezetett és fokozta a termés hozamot, és a termések méretét is (Abraham és del Pozo, 20012). Az E2FB az E2FA-hoz hasonlóan csak a foszforilálatlan RBR fehérjével lép komplexbe, és mindkét fehérje képes dimerizálni a DPA-B fehérjékkel (Magyar és mtsai., 2000, 2005, 2012; Őszi és mtsai., 2020). Az egyik feltételezett célján a G2/M fázisátmenetet szabályozó *CDKB1;1*, melynek fokozott kifejeződését lehetett megfigyelni az E2FB túltermeltetett növényi sejtekben (Magyar és mtsai., 2005; Henriques és mtsai., 2010; Henriques és mtsai., 2013).

Az E2FC túltermeltetése gátolta az S-fázis specifikus *CDC6* gén kifejeződését, ezért transzkripcionális represszor funkciót tulajdonítottak neki (del Pozo és mtsai., 2002). Ezt a feltételezést tovább erősítette, hogy az E2FC RNS interferencián alapuló csendesítésével már differenciálódó levelekben sejtciklus gének re-aktivációját lehetett megfigyelni, (pl. a *Ciklin B* csaknem százorosra nőtt expressziója, del Pozo és mtsai., 2006). Nem csak a mitózis gátlásában, hanem az endociklus elősegítésében is részt vesz (del Pozo és mtsai., 2006). Az E2FC fehérjéről is igazolták, hogy képes komplexbe lépni az RBR fehérjével. Protoplaszt transzfekciós kísérletekben az E2FC elsősorban a DPB-vel alkot dimert (Kosugi és Ohashi, 2002). Csoportunk nem közölt eredményei alapján az E2FC a DPA-val is képes heterodimerizálódni, de a levélfejlődés során elsősorban E2FC-DPB komplex a domináns formája, csíranövényeken végzett fehérjekomplex tömegspektrometriás analízise azonban mind a két DP faktort kimutatta, mint E2FC kölcsönható (Pettkó-Szandtner nem közölt eredményei alapján). Egy másik tanulmány során kimutatták, hogy az E2FC és az E2FB egymással ellentétes hatást fejt ki a távoli E2F rokon *DELI* gén kifejeződésére; az E2FB aktiválja, míg az E2FC represszálja. A *DELI* gén túltermeltetése gátolta, míg hiányában csökkent a ploidy szint (Berckmans és mtsai., 2011). Kimutatták, hogy az E2FC fehérje mennyisége sötétben nő meg, míg fényben lebomlik az ubiquitin-SCF útvonalon keresztül (del Pozo és mtsai., 2002; López és mtsai., 2008). Az E2FC

szerepet játszik a másodlagos sejtfaleszintézis szabályozásában (lignin, cellulóz, hemicellulóz), ahol transzkripciós aktivátor és represszor funkciót egyaránt betölt (Taylor-Teeple és mtsai., 2015).

Az E2FB-E2FC arányt az auxin szint szabályozza (del Pozo és mtsai., 2002; Magyar és mtsai., 2005). Az auxin dózis-függően szabályozza a növekedést; alacsony auxin szint sejtmelegnyúláshoz, míg magas auxin szint a melegnyúlás gátlásához vezet. A magas auxin koncentráció egyben az összeállapot fentartásában és az osztódási képesség megőrzésében is fontos szerepet játszik (Scheres és Xu, 2006). Az E2FB és az E2FC fehérjék stabilitását az auxin ellentétesen szabályozza. Az E2FA auxin általi aktivációja fontos szerepet tölt be a mellékgyökér képződés során lezajló aszimmetrikus osztódás aktiválásában (Berckmans és mtsai., 2011b).

### 3.3. A növényi sejtosztódás sajátosságai az embriófejlődés során

A növényi sejtosztódás az embrió fejlődése során is egy szigorúan szabályozott folyamat, ahol az osztódások gyakorlatilag egy meghatározott „koreográfia” szerint valósulnak meg. Ezek az osztódások kevésbé függnak a külső környezeti faktoroktól, ezért jó modellként szolgálnak a sejtosztódások és a fejlődés szabályozását feltáró kutatások számára. A CDKA;1 Arabidopsisban is meghatározó szerepet játszik a sejtciklus szabályozásban, csak úgy, mint más eukariótákban (Gutierrez és mtsai., 2009). Az állatokkal ellentétben azonban, az Arabidopsis embrió az evolúciósan konzervált CDKA;1 hiányában is képes fejlődni, bár ezek az embriók sokkal kevesebb sejtet tartalmaznak, mint a vad típus. A CDKA;1 egyik fő cél (szubsztrát) fehérjéje az RBR. A *cdka;1* mutánsok lényegesen kevesebb sejtet fejlődnek, ami az RBR fokozott működésére enged következtetni (alul foszforilált állapota a domináns). Ezt a feltételezést támasztotta alá, hogy a *cdka;1* mutáns növények növekedését (pl retardált gyökér fejlődést) részlegesen helyre lehetett állítani az RBR egyidejű mutációjával (*rbr1-2*; Nowack és mtsai., 2012). Ez azért is érdekes, mert az *rbr1-2* mutáns a vegetatív fejlődése során nem mutat makroszkópiás elváltozást a kontrollhoz képest (Chen és mtsai., 2011). A CDKA;1, amely a növények legfőbb RBR kináza, szabályozó komplexet hoz létre a D-típusú CIKLIN (CYCD) alegységgel. A CYCD alegység önálló és átfedő szövetspecifikus mintázattal is rendelkezik a fejlődő magokban, mutációja pedig késlelteti az embrió fejlődését (Collins és mtsai., 2012). A CYCD az RBR-hez az LxCxE motívumán keresztül kapcsolódik (ahol X lehet bármilyen aminosav), amely az RBR foszforilációjához, és ez által inaktivációjához vezet (Morgan 2007; Boniotti és Gutierrez 2001). Az *rbr* mutáns embriók (co-suppression vagy röviden csRBR

mutáns) képesek a normál fejlődésre, viszont megközelítően kétszer annyi sejtet tartalmaznak, mint a vad típusú kontroll embriók (Gutzat és mtsai. 2011). Az *rbr* mutáns embriókban a sejtszám megemelkedése a mag és embrió érési szakasz során következik be, ami arra utal, hogy az RBR általi gátlásra szükség van a sejtosztódási fázisból való kilépéshez (Nowack és mtsai., 2012). Az RBR fehérjére a korai csíranövény stádium során a heterotróf-autotróf átmenet szabályozásakor is szükség van (Gutzat és mtsai., 2011). Az RBR a csíranövény létrehozása során kölcsönhat a POLYCOMB REPRESSIVE COMPLEX 2-vel (PRC2) és a hiszton H3 H3K27me3 kromatin módosítása által csendesíti a késői embrióérésben részt vevő géneket, mint például az *ABI3*-at és a *LEC2*-t, így meghatározó szerepet játszik az autotróf fejlődési átmenetben. Csírázás után az *rbr* mutáns csíranövények megakadnak a fejlődésben, képtelenek továbblépni az autotróf növekedés irányába. Ennek oka, hogy a csíranövények cukortartalékai megnövekednek, mivel a SUT4 cukortranszportert az RBR hiányában nem gátolja a PRC2, így a cukor nem tudja beindítani a sejtosztódást. Amennyiben a növény kívülről cukrot kap, aktiválódik a sejtosztódás, de kontrollálatlan növekedéshez és a késői embriógenézisben részt vevő *ABI3* és *LEC2* gének expressziójához vezet (Gutzat és mtsai., 2011), jelezve, hogy az RBR fehérje a sejtciklus szabályozó géneken kívül a magérési gének szabályozásában is részt vesz (Gutzat és mtsai., 2012). Arról viszont nem tudunk, hogy a növényi RBR az E2F transzkripció faktorokkal együtt hogyan szabályozza a sejtosztódást a mag fejlődése során, valamint arról sem, vajon az RBR-E2F mechanizmus részt vesz-e a mag érési folyamataiban, és ha igen akkor hogyan, mely E2F faktorokkal közösen. Alábbi munkánk eredményei választ adhatnak arra a kérdésre, hogy miként kapcsolódhat egymáshoz a sejtosztódás szabályozása és a mag érésének folyamata.

### **3.4. A sejtosztódási szabályozás egy új, konzerválódott eleme a DREAM komplex**

Az eukarióta sejtosztódás szabályozásának új felfedezése a DREAM, egy több komponensből álló fehérje komplex. Ezt a transzkripció faktorokat magába foglaló fehérje komplexet az állati modell élőlényekben mutatták ki először, összetétele a különböző állati fajokban meglepően hasonló. A fonálféregben (*Caenorhabditis elegans*) a komplex központi elemét a MuvB (Multivulva B) represszor fehérjék adják, amelyek között megtalálhatóak a fonálféreg Rb (*Lin35*), E2F (*EFL1-2*) és DP (*DPL-1*) homológjai, több más fehérjével együtt (*lin-54*, *lin-53*, *lin-37*, *lin-9* and *lin-52*), amelyeknek az E2F és Rb fehérjékhez hasonlóan transzkripció szabályozó szerepük lehet. Ezt a komplexet röviden DRM-nek keresztelték el

(DP-RB-MuvB). Hasonló összetételű fehérje komplexet izoláltak a légyből is (*Drosophila melanogaster*, dREAM – *Drosophila* RBF-E2F2 és a MuvB komponensivel rokon MYB kölcsönható fehérjék, röviden MIP), és az emlős modellekből is (DREAM –DP-Rb-E2F4-and-MuvB; Sadasivam és DeCaprio, 2013). A DREAM komplex állati sejtekben gátolja az osztódásba lépést, amikor a sejtek nyugalmi állapotban vannak (pl. növekedési faktorok hiányában). Az osztódásba lépés során, a sejtciklus aktivátor E2F-ek bekapcsolják az S-fázisba lépéshez szükséges géneket (függetlenül a DREAM komplextől). Ahogy a sejtek áthaladnak az S-fázison és belépnek a G2 fázisba, a MYB transzkripciós faktor kapcsolódik a DREAM komplex központi egységéhez (MuvB). Ebből a szempontból a különböző állati komplexek összetétele némileg eltér egymástól; a légyben a MYB transzkripciós faktor és a represszor dE2F2-DP1 egyszerre van jelen minden sejtciklus fázisban, míg az emlősökben a G0 nyugalmi sejtciklus fázisban csak az E2F4-DP1 represszor, addig a G2-M fázisban kizárólag a MYB faktor vesz részt. A fonálféregben ugyanakkor mindezideáig nem találtak MYB homlót (Fischer és DeCaprio, 2015). A jelenlegi modell szerint a DREAM komplex elsődleges szerepe a sejtciklus fázisok koordinációjában van; megakadályozza a mitotikus gének időelőtti bekapcsolódását (Sadasivam és DeCaprio, 2013). Légyben kimutatták, hogy osztódó sejtekben is formálódhat E2F-RBR komplex, amely a differenciálódási gének kikapcsolásában vesz részt (Lee és mtsai., 2010).

A növényekben számos MYB transzkripciós faktor található, és *Arabidopsis*-ban öt olyan MYB TF-t azonosítottak (MYB3R1-5), amelyek struktúráisan és funkcionálisan is hasonlóak az állati MYB TF-hoz (Haga és mtsai., 2011). Egy kollaborációs munka keretében elsőként mutattuk ki, hogy az E2F és a MYB transzkripciós faktorok növényi DREAM-jellegű komplexekben vesznek részt a többi DREAM komponenssel együtt (Fischer és DeCaprio 2015).

## CÉLKITÚZÉSEK

1. Jellemezzük az aktivátor E2F transzkripciós faktorokat (E2FA és E2FB) a mag és az embrió fejlődése során. Mennyire egyediek és mennyire átfedőek a funkcióik? Egymáshoz képest hogyan fejeződnek ki a fejlődő becőben és magban mRNS és fehérje szinten, és mi jellemző a fehérje megoszlásukra a fejlődő embrióban?
2. Milyen szabályozó szerepet játszanak az aktivátor E2F transzkripciós faktorok a mag és az embrió fejlődése során különös tekintettel a sejtosztódás szabályozására? Hogyan változik meg a sejtosztódási gének kifejeződése az aktivátor *e2fa-2*, *e2fb-1* szimpla és az *e2fa-2/e2fb-1* dupla mutáns magokban és becőkben? Hogyan változik meg az embrió és az embrionális szervek mérete és hogyan alakul a sejtszám és sejtméret az *e2f* mutáns embriókban?
3. A mag érési génjeiben (*LEC2* és *WRI1*) kimutatható E2F-kötő szekvencia, ami alapján feltételezhető az E2F transzkripciós faktorok szabályozó szerepe. Megvizsgáljuk vajon az E2F faktorok szabályoznak-e más, nem sejtciklus géneket is a fejlődő magban és becőben, és ha igen, akkor ez milyen hatással van a fejlődő embrióra és magra?
4. Az állati E2F fehérjét többkomponensű ún. DREAM fehérje komplexben mutatták ki, melyek elsődleges funkciója a represszió. Megvizsgáljuk a növényekben is található-e az állatihoz hasonló összetételű DREAM komplex? Vajon a növényi E2F-ek milyen fehérjékkel lépnek kölcsönhatásba?
5. Az E2FB az Arabidopsis egyik legközelebbi rokonában, a repcében (*Brassica napus*) is megtalálható. Mennyiben hasonlít a repce E2FB az Arabidopsis rokonához? Vajon a repce *E2FB* génje az Arabidopsisban hasonló gyökér kifejeződést mutat az Arabidopsis saját, endogén E2FB fehérjéjével? Milyen fehérjékkel lép kölcsönhatásba a repce E2FB?

# ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

## 1. Kísérleti növények, növények nevelése és szaporítása, becők méret szerinti csoportosítása és gyűjtése

Munkánk során az *Arabidopsis thaliana* Columbia (Col-0) ökotípusát használtuk, mint vad típusú kontroll vonalat. A transzgenikus vonalak (pWRI1-CFP, p<sup>mutE2F</sup>WRI1-CFP, pLEC2-CFP, p<sup>mutE2F</sup>LEC2-CFP és pgBrE2FB-vYFP, részletesen lásd később) ebben a háttérben készültek el. A munkánk során felhasznált növényi vonalakat összefoglalva az 1. táblázat tartalmazza. A növényeket *in vitro* steril körülmények között folyamatos fényen, 22 °C állandó hőmérséklet mellett, félerősségű csírázási táptalajon (½ Germination Medium, röviden ½ GM) neveltük. A felhasznált ½ GM táptalaj összetevői (1 literre vonatkoztatva): 2,2 g Murashige&Skoog por (Duchefa), 10 g szacharóz, 10 ml MES (Duchefa), 1000 ml-re Milli-Q vízzel kiegészítve, 6 g agar (Duchefa) vagy 4 g Phytigel (Sigma; vízszintes lemez készítése esetén) vagy 8 g agar (függőleges lemez készítése esetén). A magvakat legalább egy éjszakán át 4 °C-on tartottuk, majd felületi sterilizálásukat 1 percig 96 %-os EtOH-ban, majd 12 percen keresztül 5 % Domestosban (nátrium-hipoklorit tartalmú oldat) végeztük el, mielőtt a steril táptalajra kerültek. A növényeket üvegházi körülmények között hosszú nappalon, (16 óra megvilágítás és 8 óra sötét periódus mellett), 22 °C állandó hőmérsékleten, talajon neveltük és hetente tápoldattal (Volldünger Linz 1-3 %) öntöztük.

A pgBrE2FB-vYFP molekuláris konstrukció létrehozásához a genomi DNS-t *Brassica napus* cv. Westar típusú repce növényből izoláltuk. A növényeket *in vitro* steril körülmények között folyamatos fényen, 22 °C állandó hőmérséklet mellett, ½ GM táptalajon neveltük. A magvakat az *Arabidopsis* esetében ismertetett módon felület sterilizáltuk, majd steril táptalajra helyeztük.

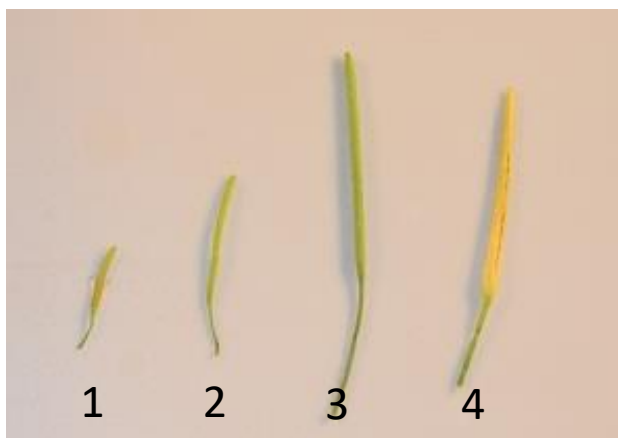
Az *Arabidopsis* magok tömegének és méretének meghatározásához, a becők méretének és számának a fő virágzati tengelyen történő meghatározásához, illetve a becőkben található magok számának a meghatározásához genotípusonként tíz növényt használtunk Van Daele és mtsai., (2012) munkája alapján. A kiszáritott magok tömegének meghatározásához analitikai mérleget (Sartorius Research R160D) használtunk, ennek során 100 db mag tömegét határoztuk meg háromszoros ismétlésben. A magok méretét ismételten 100 db magot felhasználva sztereo mikroszkóppal határoztuk meg és az Image J software segítségével értékeltük ki (Schneider és mtsai., 2012).

A kísérleteinkhez használt becőket üvegházban nevelt növényekről méret szerint gyűjtöttük be. Erre a célra az Arabidopsis növényeket két hétig *in vitro* steril körülmények között neveltük, majd vonalanként 25 növényt ültettünk ki üvegházi körülmények közé. A becők begyűjtéséhez négy különböző becőstádiumot állapítottunk meg (S1-S4, 8. ábra, 2. táblázat). Az első korai fejlődési stádiumba tartozó becőket (morfogenetikus, osztódó becők és magok), pár nappal a megtermékenyítést követően, néhány milliméteres hosszúságnál gyűjtöttük be. A második fejlődési stádium becőit 0,4-0,6 cm méretnél gyűjtöttük be (átmeneti fázis a morfogénikus szakasz és az érési szakasz között). A harmadik stádium becői zöld színűek és elérték a végleges méretüket (az érési fázisú becők). A 4. stádium becőinek mérete a 3. stádiumú becők méretéhez hasonló, de sárga színűek (az ún. post-maturation vagy érés utáni nyugalmi fázisú becők). Minden stádiumból vonalanként körülbelül 100 mg tömegű becőt gyűjtöttünk Eppendorf-csövekbe, majd a mintákat folyékony nitrogénben lefagyasztottuk és -40 °C-on tároltuk.



<b>Felhasznált Arabidopsis, Brassica, Arabidopsis transzformáns és Arabidopsis mutáns vonalak</b>
<i>Arabidopsis thaliana</i> Columbia (Col-0)
<i>Brassica napus</i> cv. Westar
pgE2FA-vYFP (Őszi és mtsai., 2020)
pgE2FB-vYFP (Őszi és mtsai., 2020)
pgRBR-CFP (Őszi és mtsai., 2020)
pgE2FA-GFP (Magyar és mtsai., 2012)
pgE2FB-GFP (Őszi és mtsai., 2020)
pgMYB3R3-GFP (Kobayashi és mtsai., 2015)
pgMYB3R4-GFP (Kobayashi és mtsai., 2015)
<i>e2fa-1</i> : MPIZ-244 (Berckmans és mtsai., 2011b)
<i>e2fa-2</i> : GABI-348E09 (Berckmans és mtsai., 2011b)
<i>e2fb-1</i> : SALK_103138 (Berckmans és mtsai., 2011a,b)
<i>e2fb-2</i> : SALK_120959 (Horváth és mtsai., 2017)
<i>e2fa-2/e2fb-1</i> (Heyman és mtsai., 2011)
<b>Munkánk során előállított Arabidopsis transzformáns vonalak</b>
pWRI1-CFP
p <sup>mutE2F</sup> WRI1-CFP
pLEC2-CFP
p <sup>mutE2F</sup> LEC2-CFP
pgBrE2FB-vYFP

**1. táblázat:** Munkánk során felhasznált és létrehozott transzgenikus Arabidopsis és Brassica növényi vonalak jegyzéke.



Becőstádium	Beporzás utáni napok száma
1.	2-3
2.	4-7
3.	8-12
4.	13-17

**8. ábra, 2. táblázat:** Különböző fejlődési stádiumú becő minták, melyek a különböző magfejlődési állapotokat mutatják be. A beporzás utáni napok számát a táblázat jobb oldalán jelöltük.

## 2. Plazmid konstrukciók létrehozása

### 2.1. Genomi DNS tisztítása

Lúdfű és repce esetében is ugyanannak a CTAB extrakciós módszernek a segítségével tisztítottunk DNS-t csíranövényekből. A mintákat folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, majd homogenizáltuk. 0,6 ml feltáró puffert adtunk 100 ml fagyasztott mintához, majd 65 °C-on 10 percig inkubáltuk. A feltáró puffer alkotói 100 ml-re vonatkoztatva: 2 g CTAB, 10 ml 1M TRIS-HCl (pH8), 28 ml 5M NaCl, 4 ml 0,5 M EDTA és frissen hozzáadva 20 µl/ml β-merkaptotanol. Az inkubációt követően 5 percre jégre helyeztük a mintákat, majd 600 µl kloroform-izoamilalkohol (24:1 arányban) hozzáadása után összeráztuk és 10 percig centrifugáltuk őket maximális fordulatszámon. A felülúszóhoz 700 µl izopropanolt adtunk és óvatosan összeforgattuk az elegyet. Ezután 5 percig szobahőn inkubáltuk a mintákat, majd 10 perces centrifugálást követően 500 µl 70 %-os EtOH-al mostuk a pelletet. Ezt követően 5 perces centrifugálás következett, amely után 2 percig, 65 °C-on szárítottuk a csapadékot. Végül 40 µl RNáz tartalmú TE puffer-ben oldottuk fel a DNS-t. A minták tisztaságát és mennyiségét 1 órás szobahőn való inkubálás után elektroforézissel (1%-os agaróz gélben), valamint 260 nm-en nanodroppal (NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometers) ellenőriztük.

## 2.2. Genomi klónok létrehozása

A promóterek (pBrE2FB, pWRI1, pLEC2) illetve a *BrE2FB* gén WT típusú Arabidopsis növényekbe történő klónozásához a 2.1 pontban leírtak alapján genomi DNS-t izoláltunk vad típusú Arabidopsis növényekből, illetve repceből, melyet templátként használva felszaporítottuk az adott promóterek (1000-, 3162- és 1864 bp hosszúságú DNS szakaszokat a *BrE2FB*, a *LEC2* és a *WRI1* promóter régiójából, amelyek a transzlációs start kódon előtt helyezkednek el) és Brassica *E2FB* gén kódoló szekvenciáját is (ezt egy 3481 bp hosszúságú DNS szakasz kódolja). A reakcióhoz felhasznált primerek a későbbi “donor” vektorba építés miatt úgynevezett attB1 (forward primerhez kapcsolt) és attB2 (reverz primerhez kapcsolt) szekvenciákat is tartalmaztak. A primereket a 3. táblázat tartalmazza. Az amplifikáláshoz *Phusion* DNS polimeráz (Thermo Scientific) enzimet használtunk. Egy 50 µl végtérfogatú reakcióhoz a következő komponensek szükségesek: 1x *Phusion* Green GC puffer, 1 U *Phusion* DNS polimeráz, 0,2-0,2 mM dNTP, 0,5-0,5 µM forward és reverz primer, 3 % DMSO és 20-50 ng genomi DNS templát. A felamplifikált PCR termékeket elektroforézissel (1 %-os agaróz gélben) ellenőriztük.

Név, gén azonosító kód	Forward primer (5'-3')	Reverz primer (5'-3')
pWRI1 (AT3G54320)	CTCTGAAACGAATATATGATACTA	TAAACTCTGAGAAAGTTTAGATTT
pLEC2 (AT1G28300)	TGATTTAAACTTTTCGCTTGGGCA	TTTCCCGGAGAGAGAGAGAGAGAGA
pBrE2FB (Bra006615)	TTTACTGAGAACCACCATCTGTAC	GGGAGCGAATCTCGAAAATCTCTC
gBrE2FB (Bra006615)	ATGTCGGACTCTCAGCAAGAGCAA	GCTACATGTAGATCTAGATCTCGT

**3. táblázat:** Az Arabidopsis *WRI1*, *LEC2* és a Brassica *E2FB* gének promóter (pWRI1, pLEC2, pBrE2FB) illetve a *BrE2FB* gén (gBrE2FB) klónozásához használt primerek és szekvenciájuk.

## 2.3. PCR termékek tisztítása poletilén-glikollal (PEG)

Az előzőleg amplifikált PCR termékeket polietilén-glikol segítségével tisztítottuk a „donor” vektorba történő építés előtt. 50 µl végtérfogatú PCR termékhez 100 µl PEG-es oldatot (26% PEG8000/6,5 mM MgCl<sub>2</sub>/0,6 M Na-Acetát pH 6-7), 50 µl steril vizet és 1 µl lineáris akrilamidot adtunk. A kapott elegyet vortexeltük, majd 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Az inkubációt követően 10 percig centrifugáltuk, majd a pelletet 100 µl 96 %-os etanollal mostuk. 10 perc centrifugálást követően a pelletet 5 percig szobahőmérsékleten szárítottuk, majd 20 µl steril vízben oldottuk fel. A tisztított PCR termékeket elektroforézissel (1 %-os agaróz gélben) ellenőriztük.

## 2.4. Klónozás Gateway<sup>TM</sup> (Invitrogen) módszerrel, homológ rekombináció segítségével

A WT típusú növényekbe visszajuttatni kívánt genomikus klónokat; a promóter-gén-vYFP (pgBrE2FB-vYFP), illetve riporter konstrukciókat; vad típusú és mutáns promóteres promóter-CFP változatokat egyaránt (pWRI1-CFP; p<sup>mutE2F</sup>WRI1-CFP; pLEC2-CFP; p<sup>mutE2F</sup>LEC2-CFP) az Invitrogen által forgalmazott Gateway<sup>TM</sup> rendszer segítségével készítettük el. A felszaporított promóterek és gén először külön-külön „donor” vektorba kerültek (BP klónozási reakció), majd az így kapott „entry” vektorból különböző kombinációkban (promóter-gén-vYFP; promóter-CFP-NOST) „destination” vektorba építettük őket (LR klónozási reakció). Az így létrehozott plazmidokat XL-1 Blue E. coli kompetens baktérium sejtekbe transzformáltuk felszaporítás és plazmid tisztítás céljából. A reakciók eredményeként a növényekbe bejuttatni kívánt konstrukciókat tartalmazó plazmidokat kaptuk. A BP klónozási reakció során ampicillint, míg az LR klónozási reakciót követően kanamicint használtunk szelekciós ágensként. A rendszer a transzformálás hatékonyságának növelése céljából a két antibiotikumon kívül a *ccdB* gént is tartalmazza negatív szelekciós markerként. A *ccdB* gén terméke gátolja a DNS replikáció során a DNS giráz működését, amely elpusztítja azokat a baktérium sejteket, amelyekben nem cserélődött le a kívánt DNS szakaszra. Amennyiben a toxin *ccdB* gén a helyén marad, akadályozni fogja az átlagos E. coli baktérium sejtek növekedését, így csak azok a sejtek maradnak életben, ahol a plazmidban a *ccdB* gén kicserélődött egy másik inszertre.

## 2.5. BP klónozási reakció

A rekombinációs klónozás első lépése a tisztított fragment beépítése az úgynevezett „donor” vektorba történt (pGEMt-1R4 a promóter; pGEM-easy221 a gén entry vektora). A rekombináció az inszerten található attB régiók (B1 és B2) és a donor vektor attP régiói (P1 és P2) között megy végbe. Egy 10 µl végtérfogatú reakciót a következőképpen állítottunk össze: 150 ng donor vektor (pGEMt-1R4; pGEM-easy221), 150 ng tisztított inszert, 2 µl BP klonáz enzim és 1x TE puffer. Az elegyet 25 °C-on inkubáltuk egész estén keresztül. A reakciót 1 µl proteináz K hozzáadásával állítottuk le, amit 37 °C-on 10 percig inkubáltunk, majd az elegyet E. coli (XL-1 Blue) kompetens baktérium sejtek transzformálására használtuk fel.

## 2.6. LR klónozási reakció (hármass Gateway klónozás)

A rekombinációs klónozás második lépése három különböző inszertet tartalmazó entry vektor (promóter, gén, YFP tartalmú) attL régiói (L1 és L2) és a destination vektor attR régiói (R1 és R2) között megy végbe. Egy 10 µl végtérfogatú reakciót a következőképpen állítottunk össze: 75-75 ng az inszertet tartalmazó entry vektorokból (pGEMt-1R4, pGEM-easy221, és a pGEMt-easy2R3 a megfelelő fluoreszcens taggal, mi a Venus YFP-ét használtuk), 75 ng „destination” vektor (pGreen alapú plazmid: pGRII229-R4R3), 2 µl LR klonáz enzim és 1x TE puffer. A reakciót ismételt 1 µl proteináz K hozzáadásával állítottuk le (37 °C-on 10 perc inkubáció), majd az eleggyel *E. coli* (XL-1 Blue) kompetens baktérium sejtekbe transzformáltunk.

## 2.7. Hely specifikus mutációk létrehozása, a Quick change mutagenesis módszerével

Az úgynevezett Quick Change mutagenesis módszer (Papworth és mtsai. 1996) segítségével mutációt hoztunk létre a WRI1 és a LEC2 promóterek E2F kötő helyén. A WRI1 promóter esetében a -359 bp pozícióban (a transzlációs START helytől upstream) található TTTCCCCC E2F kötő helyet TTTCCAAC-re változtattuk meg, míg a LEC2 promóter esetében a -2 bp pozícióban található CGGGAAAA motívumot TTGGAAAA-vá mutáltattuk (Függelék 33. ábra). A mutációhoz használt primerek szekvenciáit az 4. táblázat tartalmazza. A mutáció létrehozásához azokat az entry vektorokat használtuk fel, amelyek már tartalmazták a WRI1 és LEC2 promótereket. A mutagenesis során az egész plazmid átírásra került, ehhez a nagy hűségű *Phusion* DNS polimerázt (ThermoScientific) használtuk. Az újonnan szintetizált plazmid DNS nem tartalmazott metilációt, és így a PCR után a felamplifikált plazmidot inkubáltuk DpnI enzimmel 1 órán keresztül 37 °C-on, ami a metilált eredeti hibátlan templát plazmidot leemésztette. Ezt követően az elegyet a mutációt tartalmazó plazmiddal *E. Coli* kompetens baktérium sejtekbe transzformáltuk. Az izolált plazmidokban a mutációt DNS szekvenálással igazoltuk.

Név	Forward primer	Reverz primer
pWRI1-E2F-MUT	CATTCCAAC <b>T</b> TTTCC <b>A</b> CAAAAA ATTAGAG	TCTAATTTT <b>T</b> TG <b>TT</b> GGAAAAGT TGAATG
pLEC2-E2F-MUT	CTCTCTCTCTCTCTCTC <b>TT</b> GGAAA AGCAAGTTTGTAC	TACAAACTTGCTTTTCC <b>A</b> GA GAGAGAGAGAGAGAG

**4. táblázat:** A Quick change mutagenézis során használt primerek szekvenciáinak jegyzéke (a dőlt betű az E2F-kötő szekvenciát, a piros színű betűk pedig a mutációkat jelölik, részletesebben lásd Függelék 33. ábra).

### 3. Plazmid DNS transzformálása és felszaporítása E. coli (XL-1 Blue) kompetens sejtben

A BP és LR klónozási reakciók során létrehozott plazmidokat, valamint a mutagenézissel létrehozott mutáns plazmidokat is XL-1 Blue E. coli kompetens sejtbe transzformáltuk. A transzformációt kémiai úton hősokk segítségével végeztük el, melynek során 100 µl jégen kiolvasszott XL-1 Blue kompetens sejthez 5 µl plazmidot tartalmazó elegyet adtunk. 30 percig jégen inkubáltuk őket, majd hősokknak tettük ki, ami 42 °C-on 40 másodperces inkubációt jelentett. Ezután 5 percre jégre kerültek a baktérium minták, majd 900 µl folyékony LB tápoldat hozzáadása következett, amellyel 37 °C-on 1 órán keresztül 250 rpm-en ráztuk őket. A rázás után az összegyűjtött sejteket a megfelelő antibiotikumot tartalmazó LB táptalajra szélesztettük és 37 °C-on O/N növesztettük (LB tápoldat összetevői 1 l-re vonatkoztatva: 10 g Bacto Tripton, 5 g Yeast Extract, 10 g NaCl, pH 7.5, szilárd táptalaj esetén 15 g Micro Agar).

### 4. A szelektált bakteriális klónok további ellenőrzése kólónia PCR segítségével

Kólónia PCR reakció segítségével ellenőriztük, hogy a kompetens sejtekbe transzformált és felnövesztett baktérium kolóniák a létrehozni kívánt molekuláris konstrukciók minden elemét tartalmazzák-e. Ehhez a táptalajon felnövesztett kolóniákból steril pipettahegy segítségével mintát vettünk, amelyet feltáró oldatban (1 % TritonX-100, 20 mM Tris pH 8.5, 2 mM EDTA) felfuszpendáltunk, majd az elegyet 10 percig 98 °C-on inkubáltuk. A minták lehűtése és centrifugálása után az elegyet plazmid templát DNS-ként használtuk fel a PCR reakcióhoz. A PCR reakció során az adott promóterekre illetve génekre specifikus primereket valamint az M13 Forward és Reverz primereket használtuk. Az amplifikáláshoz pedig DreamTaq DNS polimeráz (Thermo Scientific) enzimet használtunk. Egy 20 µl végtérfogatú reakcióhoz a következő

komponensek szükségesek: 1x DreamTaq puffer (20 mM MgCl<sub>2</sub>-dal kiegészítve), 0,5 U DreamTaq DNS polimeráz, 0,2-0,2 mM dNTP, 0,5-0,5 µM forward és reverz primer, és 5 µl plazmid templát DNS. A felamplifikált PCR termékeket elektroforézissel (1 %-os agaróz gélben) ellenőriztük.

## 5. Plazmid izolálása bakteriális tenyészetekből

Az *E. coli* XL-1 Blue sejtek transzformálását követően plazmidot izoláltunk azokból a telepekből, amelyek a kolónia PCR alapján tartalmazták a megfelelő konstrukciókat. A transzformáns telepeket megfelelő antibiotikummal ellátott 2,5 ml LB tápoldatba oltottuk le, majd a sejteket egy éjszakán át, 37 °C-on, 250 rpm-mel rázatva növesztettük. Másnap a sejteket centrifugálással összegyűjtöttük (13.000 rpm, 1 perc), majd a pelletet fellazítottuk. Ezt követően 100 µl SOL1 oldatot (50 mM glükóz, 10 mM EDTA, 25 mM TRIS, pH 7.5) adtunk a mintákhoz, mellyel vortexeltük, majd 10 percen keresztül 37 °C-on inkubáltuk őket. Ezután minden mintához 200 µl SOL2 oldatot (100 ml-re vonatkoztatva: 10 ml 10 %-os SDS, 10 ml 2 M NaOH és 80 ml steril desztillált víz) adtunk, mellyel óvatosan összeforgattuk, majd 300 µl SOL3 oldatot (100 ml-re vonatkoztatva: 60 ml 5 M K-acetát, 11,5 ml cc. ecetsav és 28,5 ml steril desztillált víz). Óvatosan összekevertük a mintákat az oldattal, majd 5 percen keresztül jégen inkubáltuk. Centrifugálást követően (13.000 rpm, 5 perc) a felülúszót 600 µl izopropanollal kevertük össze, majd 5 perig szobahőn inkubáltuk. Újabb centrifugálást követően (13.000 rpm, 5 perc) a pelletet 500 µl 70 %-os EtOH-al mostuk. Ismételt centrifugálás után (13.000 rpm, 5 perc) a pelletet 2 percig 65 °C-on szárítottuk, végül 50 µl RNáz tartalmú TE pufferben oldottuk fel a plazmid DNS-t. Az így izolált plazmid tisztaságát és mennyiségét elektroforézissel (1 %-os agaróz gélben), valamint 260 nm-en nanodroppal mértük meg.

## 6. Plazmid DNS transzformálása és felszaporítása *Agrobacterium tumefaciens* (pSoupAgricola/GV3101) sejtekben

A klónozási reakciók során létrehozott, majd az XL-1 Blue *E. coli* kompetens sejtben felszaporított és tisztított plazmid DNS-t növénytranszformálás céljából *Agrobacterium tumefaciens*-be (pSoupAgricola/GV3101) transzformáltuk. A transzformálást kémiai úton elektroporálással végeztük el. 500 µl steril vízben friss lemeztől felvettünk egy oltókacsnyi *Agrobacterium*-ot, majd 5 percen keresztül 5000 rpm-en centrifugáltuk. A felülúszót leöntöttük,

majd 50 µl steril vízben felfuszpendáltuk a pelletet és jégre raktuk. Ezután az *Agrobacterium*hoz 2 µg plazmidot adtunk. Az elegyet átpipettáztuk egy elektroporációs küvettába, majd behelyeztük az elektroporátor készülékbe. Az elektroporálás után, amely a készülék rövid elektromos impulzusát jelentette 800 µl YEB-et adtunk a mintához. Ezzel összeszuszpendáltuk, majd 1 órán keresztül 30 °C-on inkubáltuk a transzformált *Agrobacterium* sejteket. Ezután az összegyűjtött sejteket antibiotikumot tartalmazó YEB és 2 mM MgSO<sub>4</sub> tartalmú táptalajra szélesztettük és 30 °C-on 2 napig növesztettük. (YEB tápoldat összetevői 1 l-re vonatkoztatva: 5 g Beef Extract, 1 g Yeast Extract, 5 g Peptone, 5 g Szacharóz, pH 7.2, szilárd táptalaj esetén 18 g Micro Agar).

## **7. *Agrobacterium* közvetítette genetikai transzformáció, a transzformált *Arabidopsis* növények antibiotikumon történő szelekciója**

A különböző génkonstrukciókat *Agrobacterium* közvetítette genetikai transzformációval juttattuk be a megfelelő vad típusú *Arabidopsis* vonalba. A 4-6 hetes virágzó *Arabidopsis* növényeket 5 % cukor, 0,01 % Silwet L77 tartalmú *Agrobacterium* oldatba merítettük, majd egy éjszakán át lefedve tároltuk (Clough és mtsai., 1998). Ezt a lépést 7 nap múlva újra megismételtük a transzformáció hatékonyságának növelése céljából. Ezt követően hagytuk a növényeket elvirágozni, majd az érett magokat begyűjtöttük a transzformánsok további szelekciója céljából.

Az *Arabidopsis* transzformánsok első generációját üvegházi körülmények között talajon vizsgáltuk. A magok szaporítótálcára való kiszórása után 7 nappal 300 mg/ml koncentrációjú glufozinat-ammonium (Finale 14 SL; Bayer) oldattal fújtuk le a csíranövényeket, melyet 2 nappal később megismételtünk. Pár nap múlva már csak a rezisztens növények fejlődtek tovább, ezeket különálló cserepekbe ültettük át, az érett magokat papírzacskóban fogtuk fel. A transzformánsok második generációjának esetében a felületi csíramentesített magokat ½ GM 0,4 % Phytigel tartalmú táptalajon, 25 µg/ml PPT (DL-Phosphinotricin) jelenlétében csíráztattuk. A rezisztens növényegyedek megjelenéséig folyamatos fényre helyeztük a Petri csészéket a növénynevelő helységben, majd az üvegházba való kiültetést követően, az érett magokat papírzacskóban fogtuk fel és kiszárítottuk.



## 8. Western immunoblot analízis

Különböző fehérjék jelenlétének és mennyiségének kimutatása a megfelelő stádiumú *Arabidopsis* becőkből Western blott analízissel történt. A különböző vonalakból fejlődési állapotonként 40-50 db becőt gyűjtöttünk Eppendorf-csövekbe, majd folyékony nitrogénben lefagyasztottunk őket. Az éretlen becőkhöz (S1-S3) dörzsölés után feltáró puffert adtunk (25 mM Tris-HCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 15 mM EGTA, 15 mM p-nitrofenilfoszfát, 100 mM NaCl, 60 mM  $\beta$ -glicerofoszfát, 1 mM DTT, 0,1 % Igepal, 5 mM NaF, 1x proteáz inhibitor (Sigma), 1 mM fenil-metil-szulfonil-fluorid), míg az érett becők (S4) illetve 100 db száraz mag feltárása folyékony nitrogénben történt feltáró puffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0,5% (w/v) SDS, 10 % (w/v) glycerol) és 2 % (v/v) 2-merkaptoetanol (Hou és mtsai., 2005) jelenlétében, melyet 3 perc forralás és 10 perc 4 °C-os centrifugálás követett. Az utóbbi módszert használtuk a becők (S1-S4) tartalék fehérjéinek azonosítása során. A növényi kivonatok fehérjetartalmát Bradford módszerrel (Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate, Bio-Rad) határoztuk meg. Minden mintából 20-40  $\mu$ g fehérjét 10, 12 vagy 15 %-os SDS-PAGE gélen ismert fehérje molekulalétra mellett (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific) méret szerint elválasztottunk, majd Immobilon-P PVDF membránra (Merck) vittük át elektroblottolással. Ezután 1 órán át 1x TBST pufferben (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween-20) oldott 5 % sovány tejporral telítettük (telítő oldat) a membránt, majd a kimutatni kívánt fehérje által meghatározott elsődleges ellenanyagot tartalmazó telítő oldatban O/N inkubáltuk. A reakció után 3 x 10 percig mostuk 1x TBST oldattal, majd az elsődleges ellenanyag által meghatározott másodlagos ellenanyagot tartalmazó 2,5 %-os telítő oldatban inkubáltuk 45 percen keresztül. A reakciót követően 3x 10 percig 1x TBST oldattal mostuk a membránt, majd a gyártó útmutatásait követve először SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific) majd Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Merck) reagenst használtunk az ellenanyaggal reagáló fehérjék detektálására. Az enzimműködést kísérő kemilumineszcenciát röntgenfilmen (CL-XPosure™ Film, 5 x 7 in., Thermo Scientific) detektáltuk.

Ellenanyag	Hígítás	Hivatkozás
csirke poliklonális anti-RBR	1:2000	Agrisera
patkány poliklonális anti-E2FA	1:300	Leviczky és mtsai., 2019
nyúl poliklonális anti-E2FB	1:500	Magyar és mtsai., 2005
nyúl poliklonális anti-DPB	1:500	Lopez-Juez és mtsai., 2008
nyúl poliklonális anti-2S albumin	1:10000	Shimada és mtsai., 2003
nyúl poliklonális anti-12S globulin	1:10000	Shimada és mtsai., 2003
CFP/GFP	1:2000	ChromoTek

**5. táblázat:** Western immunoblott során használt ellenanyagok jegyzéke.

## 9. Fehérje komplexek tisztítása immunológiai eljárással (ko-immunoprecipitálás vagy Co-IP)

Különböző fehérjekomplexek összetételének vizsgálatához GFP-fúziós fehérjéket tisztítottunk transzgenikus Arabidopsis növényekből (pgE2FB-GFP, pgBrE2FB-vYFP, pgMYB3R3-GFP, pgMYB3R4-GFP) ko-immunoprecipitálási (Co-IP) eljárással. Fiatal Arabidopsis csíranövények első levélpárját használtuk fel összfehérje tisztítására. A begyűjtött leveleket folyékony nitrogén alatt porrá törtük. Az összfehérje kivonatot extrakciós pufferrel (25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 75 mM NaCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 15 mM EGTA, 15 mM p-nitrofenilfoszfát, 60 mM  $\beta$ -glicerofoszfát, 1 mM dithiothreitol, 0,1 % (v/v) IGEPAL CA- 630, 0,5 mM NaF, 1 mM fenilmetilszulfonil fluorid, és 1 $\times$  proteáz inhibitor koktél [P9599, Sigma]) nyertük ki. Az oldott fehérjéket centrifugálással elválasztottuk a sejt és szövettörmelékektől (4 °C, 20 perc, 13000 rpm) majd ezt követően megmértük a fehérje oldat koncentrációját (Bradford). Egyforma mennyiségű fehérjét (400-800  $\mu$ g) immunoprecipitáltunk 10  $\mu$ l Anti-GFP-Trap-hoz kapcsolt mágneses gyöngy segítségével (ChromoTek). Az immunoprecipitált fehérjéket a mágneses gyöngyökről SDS-mintapuffer segítségével választottuk le, majd 10 %-os SDS-Poliakrilamid (SDS-PAGE) gélelektroforézisen futtatva molekulasúly szerint szeparáltuk a fehérjéket. Az elválasztott fehérjéket a gélről elektroblottolással PVDF membránra vittük át, és a fehérje komponensek komplexben történő megjelenését specifikus ellenanyagok segítségével immunoblott módszerével határoztuk meg (6. táblázat).

Ellenanyag	Hígítás	Hivatkozás
csirke poliklonális anti-RBR	1:2000	Agrisera
nyúl poliklonális anti-E2FB	1:500	Magyar és mtsai., 2005
egér monoklonális anti-CDKA;1	1:4000	Sigma
GFP	1:1000	Roche

**6. táblázat:** Az immunoprecipitálásban használt ellenanyagok listája.

## 10. RNS tisztítás, cDNS írás és kvantitatív valós idejű PCR (qRT-PCR)

Az Arabidopsis becőkön végzett génexpressziós vizsgálatokhoz a CTAB-LiCl extrakciós módszer (Jaakola és mtsai., 2001) segítségével tisztítottunk RNS-t a megfelelő stádiumú becőkből. A mintákat folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, majd homogenizáltuk. 0,5 ml előmelegített feltáró puffert adtunk 100 ml fagyasztott mintához, majd 10 percig 65 °C-on tartottuk a mintákat. A feltáró puffer alkotói 1 ml-re vonatkoztatva: 2 g CTAB, 2 g PVPP, 10 ml 1 M TRIS, 11,6 g NaCl, 0,05 g Spermidin, 4 ml 0,5 M EDTA és frissen hozzáadva 20 µl/ml β-merkaptotanol. Inkubáció közben 2-3-szor erőteljesen vortexeltünk. Ezután a mintákat jégre helyeztük és egyenlő térfogatú fenol:kloroform:izoamilalkohol elegyet (25:24:1 arányban) adtunk hozzá. Vortexeltük, majd lecentrifugáltuk a mintákat. A felülúszóhoz egyenlő térfogatú kloroformot, majd 1/3-ad térfogatú 8 M-os LiCl-et adtunk, és 2 óráig 4 °C-on inkubáltunk. 4 °C-ra előhűtött centrifugában 20 percnnyi centrifugálás után a csapadékot 0,5 ml 2 M-os LiCl-al mostuk, majd 0,3 ml 0,5 %-os SDS oldatban visszaoldottuk. Ezután egyenlő térfogatú kloroform-izoamilalkoholt (24:1) adtunk hozzá. Centrifugálás után három térfogatnyi 96 %-os etanolt és 0,1 térfogatnyi 3 M-os Na-acetátot (pH 4.8) adtunk a felülúszóhoz, majd -80 °C-on egy óráig inkubáltuk a mintákat. 4 °C-ra előhűtött centrifugában 20 percnnyi centrifugálás után a pelletet 0,4 ml 70 %-os jéghideg EtOH-al mostuk, majd szárítottuk és végül 20 µl jéghideg DEPC kezelt hideg vízben visszaoldottuk. Az RNS mennyiségét 260 nm-en mért optikai denzitás meghatározásával, nanoprop (NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometers) segítségével mértük meg. A minták tisztaságára és minőségére az OD 260/280 és az OD 260/230 arányból következtettünk, illetve elektroforézissel (1 %-os agaróz gélben) ellenőriztük az esetleges degradációt.

A cDNS templátok előállításához 2 µg DNáz (Fermentas) kezelt RNS-t használtunk kiindulásként, amelyet a Revert Aid Reverse Transcriptase (Thermo Scientific) segítségével írtunk át a gyártó ajánlása szerint. A kvantitatív valós idejű PCR-hoz Maxima SYBR

Green/ROX qPCR Master Mix (2x) (Thermo Scientific) reakcióelegyet használtunk a gyártó ajánlása szerint. A qRT-PCR méréseket egy Applied Biosystems 7900-HT Fast Real-Time Detection System készülékben végeztük el az alábbi programot használva: denaturáció 95 °C 10 perc, 40 ciklus: 95 °C 15 másodperc és 60 °C 60 másodperc. Három biológiai ismétélést végeztünk, referenciagénként az UBC18-at használtuk. Az adatok kiértékelését a  $2^{-\Delta CT}$  illetve a  $2^{-\Delta\Delta CT}$  módszerrel végeztük el. A minták közötti szignifikancia szint meghatározásához a Student-féle t-próbát használtuk.

Gén neve	Foward primer	Reverz primer
<i>ORC2</i> (AT2G37560)	TCCCGAATCACAACAACTC	CCACAATAATGGAGGTTGA
<i>MCM3</i> (AT5G46280)	TGGGCAGCACATGAGGAC	CACTTTGTTATCATCTTGCAGTTT
<i>CYCD3;1</i> (AT4G34160)	GCAGCATAAGTTCAAGTGTGTAGC	AAACCGTAAGAGGCAGCTCTGG
<i>CDKB1;1</i> (AT3G54180)	TCTGTTGGTTGTATCTTTGCTGA	CATTGCTGCTCAGTTGGTGT
<i>RBR</i> (AT3G12280)	CGCTTCCATTTTGGTTTTGA	TGAACAACAGCAGCAGCAAC
<i>E2FA</i> (AT2G36010)	CAACCCAGAACTGCTATTGTT	GTCCGACTCATCATTTTCAAC
<i>E2FC</i> (AT1G47870)	TGCCGTTATGACAGTTCTTTAGGG	AGTGTTCCATCCTCAGCTTCCT
<i>E2FB</i> (AT5G22220)	GGACCGAGCGACAACAAA	AGGTGATCTCGTAGCAGTGGA
<i>WRI1</i> (AT3G54320)	AAGTACTTGTACCTCGGCACCT	CAATCGCAGCCATGTCATA
<i>LEC2</i> (AT1G28300)	GGTCCAATAACAAGAGCAGAATG	CAGCTCCATTTTGCTTCACA
<i>LEC1</i> (AT1G21970)	GTTATGGTATGTTGGACCAATCC	TTCATCTTGACCCGACGAC
<i>FUS3</i> (AT3G26790)	TGATACTCCCGAAGAAAGCC	CTATACTTGAAGGTCCAAACGTG
<i>ABI3</i> (AT3G24650)	GGCAGGGATGGAAACCAGAAAAGA	GGCAAAACGATCCTTCCGAGGTTA
<i>UBC18</i> (AT5G42990)	ACAGCAATGGACATATTTGTTTAGA	TGATGCAGACTGAACTCACTGTC
<i>CFP</i>	TGAAGTTCATCTGCACCA	CTTGTACAAGCTTCGTC

7. táblázat: A QRT-PCR során alkalmazott primerek és szekvenciák jegyzéke.

## 11. Kromatin immunoprecipitáció (ChIP)

Az E2F transzkripció faktorok kötődését a WRI1 és LEC2 promóterek E2F kötő helyéhez kromatin immunoprecipitációs vizsgálatokkal mutattuk ki. A kromatin immunoprecipitációs esszét Shale és mtsai., 2008 munkája alapján végeztük el. Növényi anyagként E2FA-GFP-t és E2FB-GFP-t expresszáló növények 2 g-nyi becőjét (S3) használtunk fel. A nukleinsav-fehérje keresztkötést 1 %-os formaldehid oldat segítségével végeztük el. A DNS-lánc 200-1000 bp-os darabokra való törését ultrahanggal történő szonikálással hajtottuk

vége. Az immunoprecipitációhoz anti-GFP poliklonális nyúl ellenanyagot használtunk (Invitrogen). A GFP kötött fehérje-kromatin komplexeket Protein agaróz gyöngyök (Millipore, Salmonsperm DNA treated) segítségével gyűjtöttük össze. A tisztított DNS-t qRT-PCR reakcióhoz használtuk, melynek során a kívánt promóter régiót a promóterre specifikus primerekkel amlipifikáltuk fel (8. táblázat).

Primer neve	Forward primer	Reverz primer
<b>WRI1prom1(-1036)</b>	ACTCGTGTGTCTGCTTAAATCA	AGCACGTGTCAATCCGAAAC
<b>WRI1prom2(-243)</b>	GACAGCGTGGAGAGTAAAGC	GGAGGAAAGGGCTAATTGGG
<b>LEC2prom1(-1342)</b>	TCATGGTTAGAAATTTGGTGACAGT	TCGAAATCATAACCCATAGAACACT
<b>LEC2prom2(-110)</b>	CATCTGCAACATTTTGACTCGTT	CAGAGTTTGCGTTAGAAGAGGG

**8. táblázat:** A kromatin immunoprecipitáció során használt primerek jegyzéke. Jelöltük a primer párok nukleotid pozíciójának távolságát az E2FA és E2FB ORF ATG start kodonjától.

## 12. Fehérjék tömegspektrometriás analízise

A méréshez 7 napos ½ GM táptalajon csíráztatott Arabidopsis csíranövényeket használtunk. Vizsgált vonalanként 150-200 db csíranövényt folyékony nitrogénben lefagyasztottunk, majd homogenizáltunk. A csíranövényekből az összeportein kivonást Henriques és mtsai., 2010 munkája alapján végeztük el. A fehérje kivonatot (4 mg/IP) kisméretű mágnes gyöngyökhöz kapcsolt anti-GFP antitest (MACS® Technology, Miltenyi) segítségével immuntisztítottuk, oszlopon tripszinnel emésztettük, majd tömegspektrofotométeren való futtatással vizsgáltuk. Az eluátumot Pettkó-Szandtner Aladár és Darula Zsuzsa (SZBK Proteomikai csoport) tömegspektrométeren analízálta (Orbitrap-Elite, Thermo Fisher Scientific).

## 13. Embriópreparálás, mikroszkópos vizsgálatok

A jelölt fehérjekonstrukciókat tartalmazó transzgenikus vonalak (pgE2FA-3xYFP, pgE2FB-3xYFP, pgRBR-3xCFP, pWRI1-CFP, p<sup>mutE2F</sup>WRI1-CFP) éretlen embrióit sztereo mikroszkóp alatt preparáltuk, majd Leica SP5 AOBS konfokális lézer scanning mikroszkóp (Leica, Wetzlar, Németország) segítségével vizsgáltuk. Az érett magokból az embriókat (WT, *e2fa-2*, *e2fb-1*, *e2fa-2/e2fb-1*) 1 órás áztatás után preparáltuk sztereo mikroszkóp alatt. Az izolált embriókat a konfokális mikroszkópos vizsgálatok előtt propidium jodiddal (PI) festettük. A PI

egy fluoreszcens molekula, amely képes a sejtek külső felszínét/sejtfalát festeni, de az élő sejtek membránján nem hatol át, piros színnel jelölődik. Munkánk során 2 %-os PI oldatot (Sigma) használtunk. A pWRI1-CFP és pLEC2-CFP riporter konstrukciókat illetve a pgBrE2FB-vYFP és pgE2FB-vYFP konstrukciókat expresszáló transzgenikus növényeket a konfokális mikroszkópos vizsgálatokhoz függőleges lemezen növesztettük. 7 napos csíranövények gyökerét vizsgáltuk PI-os kezelést követően. Az *e2fa-2/e2fb-1* dupla mutáns érett pollenszemeit konfokális lézer scanning mikroszkóp segítségével vizsgáltuk. A mikroszkópos vizsgálat előtt 4',6-diamidino-2-fenilindollal (DAPI) festettük a pollenszemeket. A DAPI egy univerzálisan használható DNS-hez kötődő fluoreszcens festék.

## 14. Bioinformatikai módszerek

Munkánkhoz az alábbi internetes portálokat és programokat használtuk. Az Arabidopsis gének nukleotid sorrendjét a TAIR (<http://www.arabidopsis.org/>) adatbázisból nyertük, más szekvenciákhoz az (<http://brassicadb.org/brad/>) és az NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) weboldal segítségével jutottunk. A szekvenálások eredményét a ChromasLite program (<http://chromas-lite.software.informer.com/2.0/>) segítségével tekintettük meg. A szekvencia homológiák vizsgálatához az NCBI BLAST szolgáltatását (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) és az Clone Manager programot, Sci-Ed Softwaret (<http://www.scied.com/>) használtuk. PCR primerek tervezéséhez Primer3 (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) weboldalt használtuk. A qPCR primerek tervezéséhez a Roche primertervező oldalát ([https://lifescience.roche.com/en\\_hu/brands/universal-probe-library.html#assay-designcenter](https://lifescience.roche.com/en_hu/brands/universal-probe-library.html#assay-designcenter)) vettük igénybe. A sztereo mikroszkópos képek kiértékeléséhez az Image J programot használtuk. A dolgozat szerkesztéséhez, az adatok kezeléséhez és a táblázatok elkészítéséhez a Microsoft Office programcsomagot használtuk (<http://www.microsoft.com>).

# EREDMÉNYEK

## 1. Az *E2F* transzkripció faktorok génexpressziós mintázata a becőfejlődés során

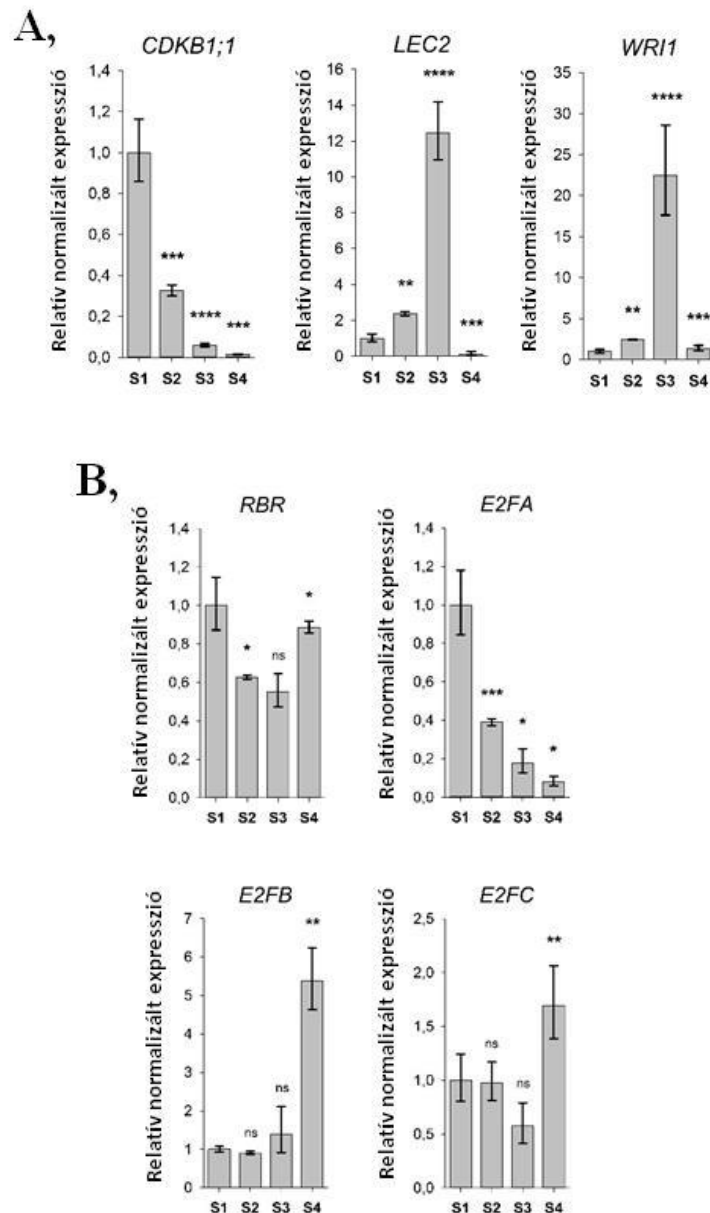
Az aktivátor *E2F* transzkripció faktorok jellemzése során elsőként az *E2FA* és *E2FB* gének expressziós mintázatát határoztuk meg a fejlődő Arabidopsis becőkben. Ehhez különböző fejlettségi stádiumú becőket gyűjtöttünk vad típusú Arabidopsis növényekről (Col-0 ekotípus) négy különböző méretben (S1-S4, 8. ábra). Kísérleti rendszerünk tesztelését fázis specifikus gének expressziós analizisével kezdtük. Az osztódási fázis meghatározásához egy G2-M fázis specifikus sejtciklus szabályozó gén, a *CYCLIN-DEPENDENT KINASE B1;1* (*CDKB1;1*) expresszióját vizsgáltuk meg, amely egyben az aktivátor *E2F*-ek ismert célgénje (Vandepoele és mtsai., 2005; Henriques és mtsai., 2010; Őszi és mtsai., 2020). A *CDKB1;1* expressziója a legfiatalabb becőkben (S1) volt a legmagasabb, a következő becőállapotban (S2) a szintje visszaesett, a két utolsó becőstádiumban (S3-S4) pedig már a detektálási szint határára süllyedt (9. A ábra). Az érési fázis meghatározásához két érési marker gén, a *LEAFY COTYLEDON2* (*LEC2*), és a *WRINKLED1* (*WRI1*) transzkripció faktorok expresszióját követtük nyomon (részletesebben lásd a bevezető részben). Mindkét gén alacsonyan fejeződött ki az osztódási fázisban (S1-2), míg a legmagasabb expressziót a harmadik becőstádiumban mutatták (S3), azokban a még zöld becőkben, amelyek már elérték végleges méretüket. A negyedik becőstádiumban (S4) mindkét gén expressziója visszaesett a detektálási szint alá (9. A ábra). Összegezve tehát az eredményeket, a sejtosztódás a fiatal becőstádiumokban volt a legaktívabb (ezen belül is S1>S2 intenzitással), és az érési fázis az átmeneti stádiumban vette kezdetét (S2), amikor az osztódási aktivitás már csökkent (S2), maximumát pedig a harmadik becőstádiumban (S3) érte el. A negyedik becőstádiumban (S4) sem a sejtciklus szabályozásában részt vevő, sem pedig az érési géneket nem, vagy csak alig tudtuk detektálni. Mindezek alapján az S1 a morfogénikus-osztódási szakasz, az S3 az érési fázis, az S2 a két szakasz közti átmeneti fázis, míg az S4 az érés utáni nyugalmi fázist reprezentálja.

Annak érdekében, hogy jobban megértsük az *E2F* transzkripció faktorok és az *RBR* fehérje szabályozási funkcióját a magfejlődés során, megvizsgáltuk ebben a rendszerben mindhárom *E2F* (*E2FA*, *E2FB* és *E2FC*) és az egyedüli *RBR* gén expresszióját is. A represszor típusú *E2FC* és az *RBR* expressziója némi fluktuáció mellett, közel állandó transzkripció szinten

volt jelen a magfejlődés során (9. B ábra). Az *E2FA* expressziója nagyon hasonlított a sejtciklus szabályozó *CDKB1;1* gén mintázatához, legmagasabb az osztódási fázisban volt, majd folyamatosan csökkent, de ellentétben a *CDKB1;1*-el még az érési fázisban (S3-S4) is detektálható szinten maradt. Az *E2FB* az *E2FA*-hoz hasonlóan, a korai magfejlődési állapotokban (S1-S2) szintén detektálható volt, de ellentétben az *E2FA* csökkenő expressziójával, szintje tovább emelkedett és az érés utáni nyugalmi fázisban érte el a csúcértékét (9. B ábra). Ezek az eredmények összhangban állnak az Arabidopsis eFP browser expressziós adataival (Függelék 29. ábra; Winter és mtsai., 2007). Eredményeink alapján az aktivátor típusú *E2FA* és *E2FB* transzkripciós faktorok expressziós mintázata a fejlődő becőben egyrészt átfed egymással (osztódási szakasz), másrészt eltéréseket is mutat, ami funkcionális különbségekre utal.

Génexpressziós eredményeink kiegészítéseképpen az Arabidopsis eFP browser segítségével megvizsgáltuk, hogy az embriófejlődést szabályozó hormonok (auxin, ABA, GA3) milyen hatással vannak az aktivátor *E2F* és *RBR* gének expressziójára a fiatal csíranövényben és az érett magban. Ezt a Függelék 35. ábrája mutatja be.





**9. ábra: Az *E2F* és az *RBR* gének expressziós analízise a becő és magfejlődés során qRT-PCR módszerével.**

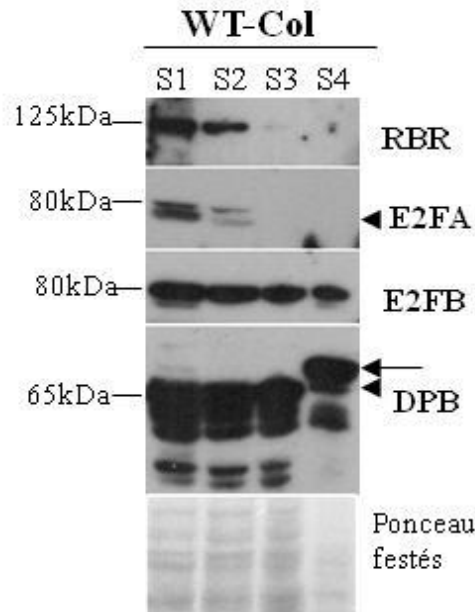
**A,** A sejtosztódás specifikus, G2-M fázisban kifejeződő *CDKB1;1* és a magéresi gének (*WRI1* és *LEC2*) expressziós mintázata a négy különböző fejlődési stádiumú, vad típusú *Arabidopsis* becő mintákban (S1-4).

**B,** A három E2F transzkripciós faktor (*E2FA*, *E2FB* és *E2FC*) és az *RBR* gén expressziós mintázata a négy különböző fejlődési stádiumú, vad típusú *Arabidopsis* becő mintákban.

A relatív transzkript mennyiségek az S1 állapotú becőminták expressziós szintjéhez normalizálva lettek megadva. A feltüntetett szórás három biológiai ismétlésből származó értékekre vonatkozik.  $P \leq 0,05$  (\*), 0,01 (\*\*), 0,001 (\*\*\*), 0,0001 (\*\*\*\*) szignifikáns különbségnek csak az egymást követő becőstádiumok között fogadtuk el. ns: nem szignifikáns különbség.

## **2. Az E2FA, E2FB és az RBR fehérjék felhalmozódása a becőfejlődés során**

Kíváncsiak voltunk arra is, hogyan változik az E2F és RBR fehérjék mennyisége a becő és mag fejlődése során. Ezért specifikus ellenanyagokat használtunk az aktivátor E2F és az RBR fehérjék ellen Western blot módszer segítségével és megvizsgáltuk, hogyan jelennek meg ezek a fehérjék a fejlődő becőkben. Az E2FA fehérje felhalmozódása megegyezett a transzkript szintjének megemelkedésével, az első becőstádiumban (S1) volt a legmagasabb, majd az átmeneti fázisban (S2) csökkenésnek indult és a késői fejlődési fázisokban (S3-S4) már nem tudtuk kimutatni a jelenlétét (10. ábra). A vegetatív fejlődés során az RBR az osztódó szövetek sejtjeiben nagy mennyiségben jelen lévő fehérje (Borghi és mtsai., 2010.; Magyar és mtsai., 2012; Őszi és mtsai., 2020). A magfejlődés során is ezt tapasztaltuk, fehérje szintje a fiatal becőkben (S1-S2) volt a legmagasabb, de ellentétben a génexpressziós eredményekkel az érési fázisú becőkben (S3) már alig tudtuk kimutatni. Az érést követő fejlődési stádiumban (S4) pedig teljesen eltűnt, amely azt jelzi, hogy az RBR a már kiszáradt, érett magokban nem fehérje formájában, hanem mRNS-ként raktározódik. Az E2FA és RBR fehérjékkel ellentétben az E2FB fehérje szintje egyenletesen magas volt a magfejlődés során, még az érés utáni nyugalmi fázisú becőkben is jelentős mennyiségben halmozódott fel (10. ábra). A DPA fehérjét nem tudtuk detektálni, valószínűleg azért, mert nagyon alacsony szinten van jelen. A DPB fehérje viszont az E2FB-hez hasonlóan, egy állandó magas expressziós mintázatot mutatott a magfejlődés során. Az érés utáni nyugalmi fázisban (S4) egy lassabb mobilitású változata került túlsúlyba, amely valószínűleg a DPB fehérjében bekövetkezett poszt-transzlációs módosítás okozhatott (10. ábra). Eredményeink alapján megállapíthattuk, hogy az E2FA és RBR fehérjék legnagyobb mennyiségben az osztódási fázisban, míg az E2FB fehérje a DPB dimerizációs fehérjével együtt, az érési és az érés utáni nyugalmi fázisban is jelen van. Az RBR fehérje mennyiségének csökkenése az érés utáni nyugalmi fázisban azt jelentheti, hogy az E2FB az RBR fehérjétől független szabályozási funkcióval rendelkezhet a mag nyugalmi állapotának megteremtésében.



**10. ábra: Az RBR, E2FA, E2FB és a DPB fehérjék felhalmozódása a vad típusú Arabidopsis növények (WT-Col) becő és magfejlődése során.**

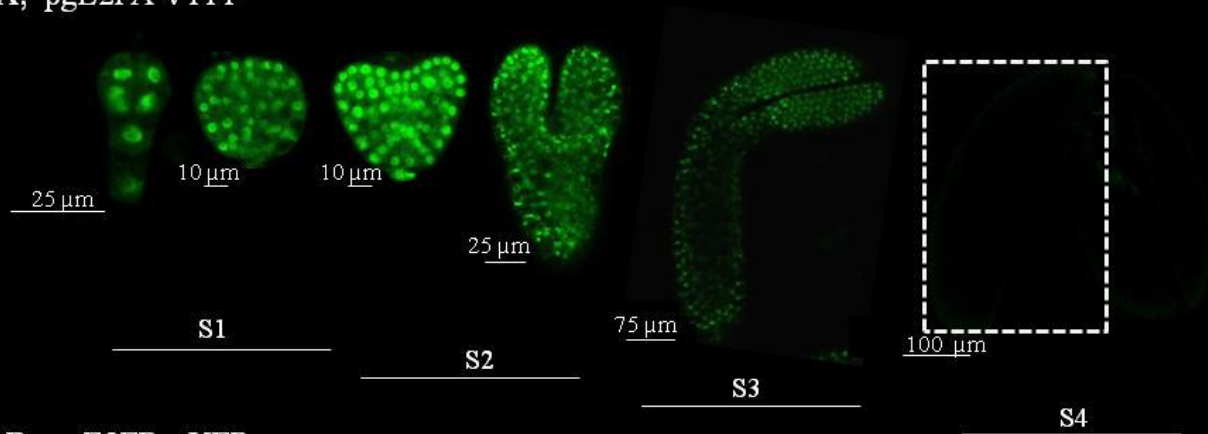
Az ábrán feltüntetett fehérjék ellen termeltetett specifikus ellenanyagokat használtuk Western blot kísérletekben (jobb oldalon jelölve a cél fehérjét). A becők fejlődési állapotát a kép tetején jeleztük (S1-4). A felvitt különböző becő stádiumú fehérje mintákat Ponceau festéssel tettük láthatóvá. A nyílhegyek a megfelelő E2FA és DPB fehérjéket, míg a nyíl a DPB egy kevésbé mobilis formáját jelöli a negyedik becő stádiumban (S4). A vizsgált fehérjék molekulásúlyát az ábra bal oldalán jeleztük.

### **3. Az aktivátor E2FA és E2FB valamint az RBR fehérjék felhalmozódása az embriófejlődés során**

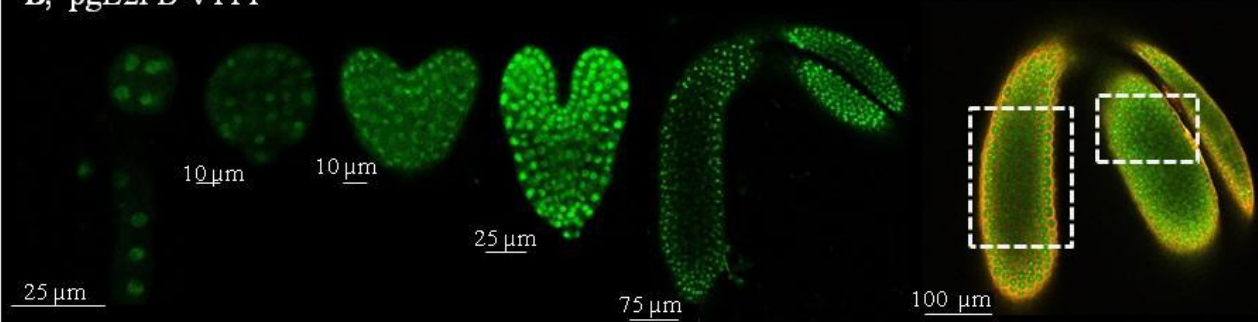
Az embriófejlődés morfogénikus szakasza a szív stádiumban fejeződik be, ezt követően az osztódások gyakorisága visszaesik és a késői torpedó stádiumban már csak sejtmegnyúlással növekszik a fejlődő embrió (Raz és mtsai., 2001). Korábban olyan transzgenikus Arabidopsis növényeket hoztunk létre, ahol az E2FA, E2FB és az RBR fehérjéket fluoreszcens fehérjével jelöltük meg, és a saját promóter-szabályozó régiójuk ellenőrzése alá vontuk őket, így azok a rájuk jellemző expressziós mintázatot megtartották (pgE2FA-vYFP, pgE2FB-vYFP, pgRBR-CFP – Őszi és mtsai., 2020). Ezeknek a vonalaknak a segítségével vizsgáltuk meg az E2FA, E2FB és RBR fehérjék térbeli és időbeli mintázatát az embriófejlődés során. Különböző fejlődési állapotban lévő, még éretlen embriókat preparáltunk a transzgenikus Arabidopsis magokból és konfokális lézer scanning mikroszkóppal vizsgáltuk meg őket (11. ábra). Az embriófejlődés során az E2FA és E2FB fehérjék lokalizációja sejtmagi, és mindkét fehérje széleskörűen

megtalálható minden embrionális sejtben, az osztódó globuláris állapotú embriótól kezdve egészen a mitótikusan már többnyire inaktív „sétapálca” (walking-stick) állapotú embrióig bezárólag (11. A,B ábra). Az E2FA-vYFP jelet (sárgán fluoreszkáló fehérje) a szív állapotig találtuk a legerősebbnek, és ugyan csökkenő intenzitás mellett, de detektálható maradt az ezt követő fejlődési állapotokban is leszámítva a már teljesen kifejlett embriót (S4). Az E2FB-vYFP jel a torpedó állapotú embrióban volt a legintenzívebb, de szemben az E2FA-vYFP jellel a legutolsó embriófejlődési állapotban is kimutatható volt (11. A,B,C ábra). Az RBR-CFP jelet a szív állapottól egészen a sétapálca embrió állapotig tudtuk detektálni, viszont a teljesen érett embrióban már nem volt látható (11. D ábra). A mag fejlődése során összehangoltan fejlődik a maghéj, az endospermium és az embrió. Pontosan, hogyan koordinálódnak ezek a folyamatok még nem igazán ismert, de az E2F-RBR szabályozás ebben a folyamatban is szerepet játszhat, mert E2FA-vYFP és E2FB-vYFP jelet a fiatal magok maghéjából is ki tudtunk mutatni (11. E ábra). Eredményeink alapján az E2FA és E2FB fehérjék nem csak az osztódó embrionális sejtekben vannak jelen, hanem a poszt-mitótikus sejtekben is, bár szintjük egymással ellentétesen alakul. Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy az E2FA és E2FB transzkripciós faktorok részt vehetnek az embrió fejlődés során mind a mitótikus, mind pedig a poszt-mitótikus, ún. nyugalmi állapot kialakításának a szabályozásában, feltehetően az RBR fehérjével együttműködve.

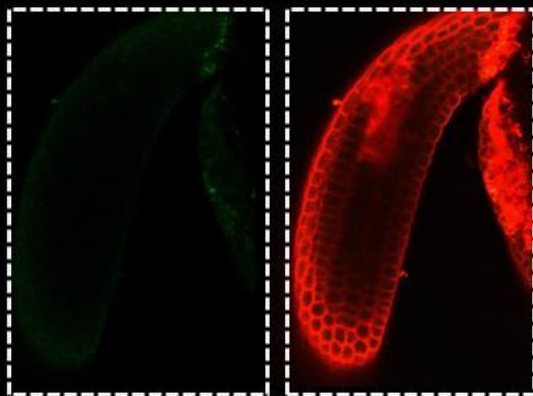
**A, pgE2FA-vYFP**



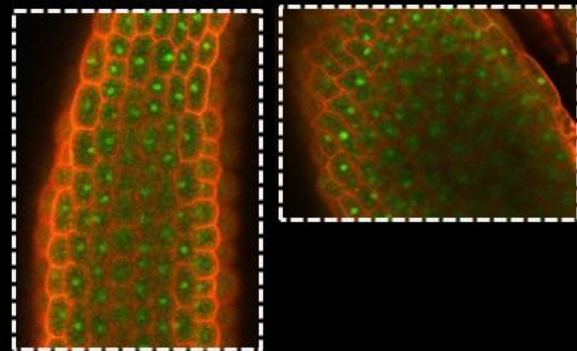
**B, pgE2FB-vYFP**



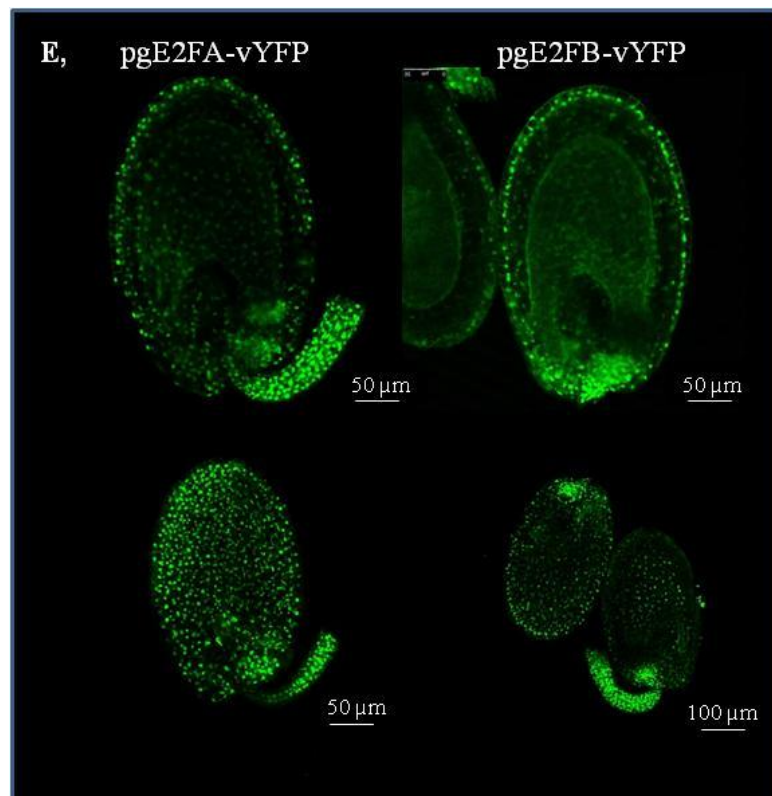
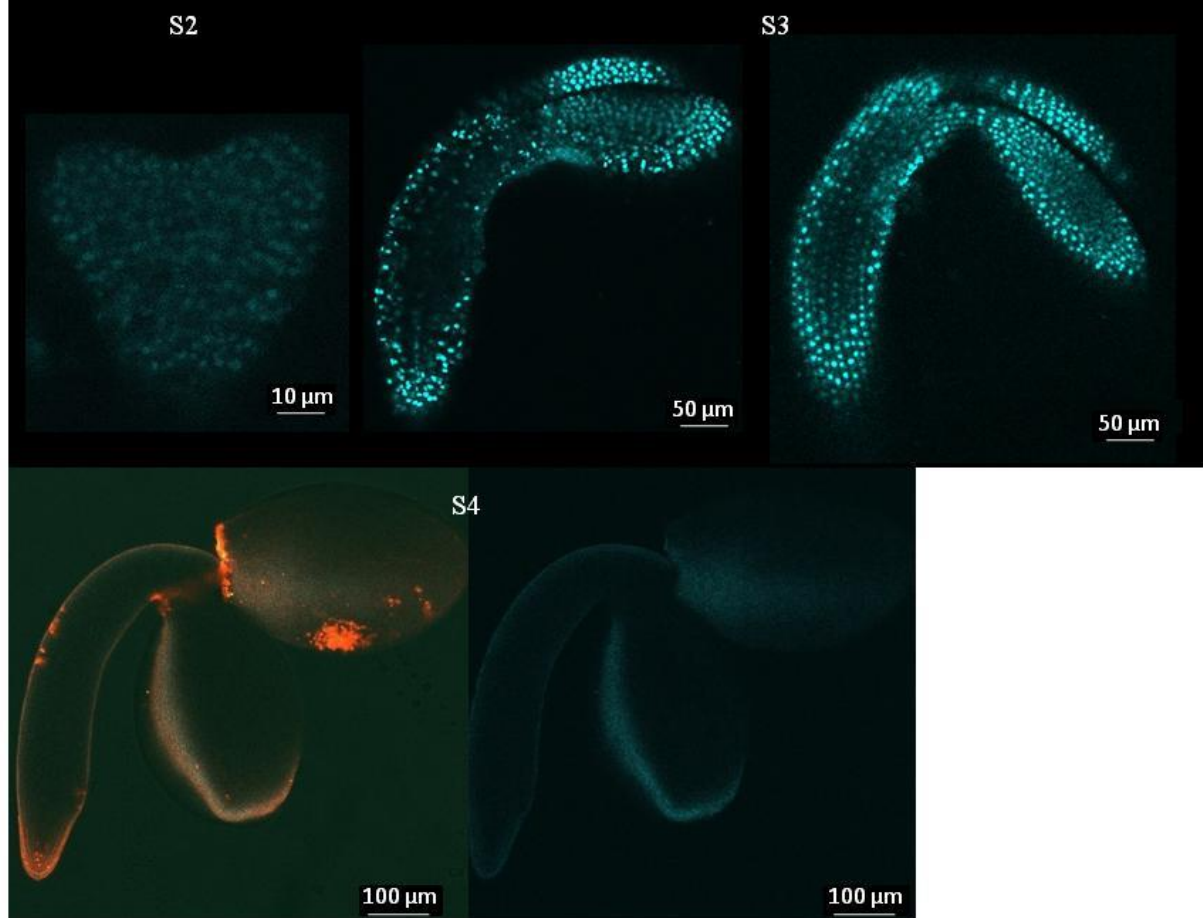
**C, pgE2FA-vYFP**



**pgE2FB-vYFP**



**D, pgRBR-CFP**



#### **11. ábra: Az E2FA és E2FB transzkripció faktorok és az RBR fehérje megjelenése az embriófejlődés során.**

**A-B,** Konfokális lézer scanning mikroszkóppal készített képek, melyeken a pgE2FA-vYFP és a pgE2FB-vYFP transzgenikus vonalak éretlen magjaiból izolált fejlődő embriók láthatóak.

**C,** Kinagyítva láthatóak a fehér szaggatott vonallal jelölt pgE2FA-vYFP és pgE2FB-vYFP érett embriók sziklevelének és embrionális szárának epidermális régiói.

**D,** Konfokális lézer scanning mikroszkóppal készített képek, melyeken a pgRBR-CFP transzgenikus vonal éretlen magjaiból izolált fejlődő embriók láthatóak.

**E,** Fiatal magok maghéjáról konfokális lézer scanning mikroszkóppal készített képek, melyek a pgE2FA-vYFP és pgE2FB-vYFP konstrukciókat tartalmazzák.

A vYFP jel zöld színnel, a CFP jel kék színnel látható, a sejtfalat PI-vel festettük piros színűre. Az érett pgE2FB-vYFP embrió esetében az YFP és a PI jelek egyesített képe látható. Az embriófejlődési állapotoknak megfelelő becőstádiumokat S1-4-ig jelöltük az ábrákon. Az embriókról készült ábrák tartalmazzák a méretskálát.

#### **4. A becőfejlődés állapotától függően az E2FA és E2FB transzkripció faktorok aktivátorként és represszorként is képesek szabályozni a sejtciklus szabályozó géneket**

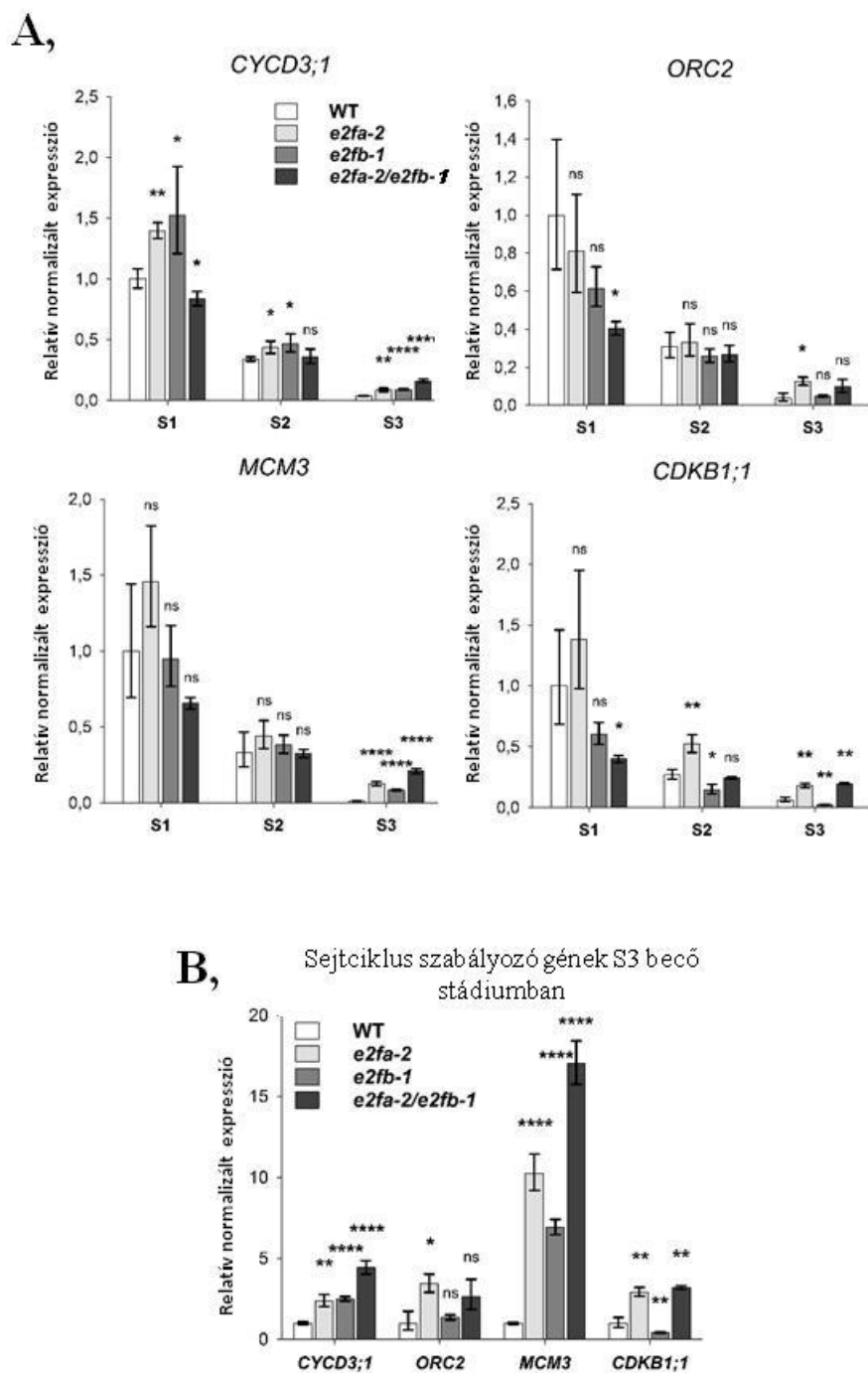
Következő lépésként megvizsgáltuk, hogy a magfejlődés során az E2FA és E2FB transzkripció faktorok szükségesek-e a sejtciklus szabályozásában részt vevő gének kifejeződéséhez. Ehhez három becőfejlődési stádiumból (S1-S3) gyűjtöttünk mintákat különböző egyedi (*e2fa-2* és *e2fb-1*), dupla *e2f* mutáns (*e2fa-2/e2fb-1*) és a kontroll, vad típusú *Arabidopsis* vonalakból. Ezek a mutáns *e2f* vonalak nem expresszálják a rájuk jellemző teljes hosszúságú transzkriptumokat és fehérjéket (Berckmans és mtsai., 2011a; Berckmans és mtsai., 2011b; Horváth és mtsai., 2017.; Kobayashi és mtsai., 2015, Leviczky és mtsai., 2019). A génexpressziós vizsgálat során nyomon követtük a G1-S fázis specifikus *CYCLIND3;1* (*CYCD3;1*), az S fázis specifikus *ORIGIN RECOGNITION COMPLEX 2* (*ORC2*) és *MINICHROMOSOME MAINTENANCE 3* (*MCM3*), valamint a G2-M fázis specifikus *CDKB1;1* expresszióját. Fontos megemlítenünk, hogy ezek a sejtciklus gének feltételezhetően E2F célgének is. Ahogyan az várható volt, a vad típusú, kontroll becőkben ezeknek a sejtciklus szabályozó géneknek az expressziója egymáshoz nagyon hasonló mintázatot mutatott. Legerősebben az első, az osztódási fázist reprezentáló becő mintában (S1) fejeződtek ki, ezt követően, a második becő stádiumban (S2) már csökkent a mennyiségük, míg a legalacsonyabb szintet az érési fázisban (S3) mértük (12. A ábra). Meglepetésünkre, ezeknek a sejtciklust szabályozó géneknek az expressziója az osztódási fázisban (S1) nem igazán változott meg a

szimpla *e2fa-2* és *e2fb-1* mutánsokban, és csak némi csökkenést láthattunk a dupla *e2fa-2/e2fb-1* mutánsban (12. A ábra). Jelentős eltérést csak az *ORC2* és a *CDKB1;1* esetében tudtunk megfigyelni, ami arra utal, hogy a sejtciklus gének aktivációjában az aktivátor E2F transzkripció faktorok szerepe nem nélkülözhetetlen.

A vizsgált sejtciklus szabályozó gének expressziója az érési fázisú vad típusú becőkben (S3) gyakorlatilag a detektálhatósági szint határáig csökkentek le. Érdekes módon az *e2f* mutánsok hasonló stádiumú becőiben sokkal magasabb expressziós szinteket figyelhettünk meg (12. B ábra). Az érési-fázisú becőben az összes általunk vizsgált gén expressziója jelentősen megemelkedett az *e2fa-2* mutánsban, míg a *CYCD3;1* és az *MCM3* expressziója az *e2fb-1* mutánsban is. Ez utóbbi két sejtciklus szabályozó génnek az expressziója tovább emelkedett az *e2fa-2/e2fb-1* dupla mutánsban, ami arra utal, hogy az aktivátor E2F-ek egymástól függetlenül gátolják ezeknek a géneknek a kifejeződését. Ezzel ellentétes képet láthattunk a *CDKB1;1* gén esetében: itt az expresszió csökkenését figyelhettük meg az *e2fb-1* mutáns becőjében, míg az *e2fa-2* mutánsban, hasonlóan az *e2fa-2/e2fb-1* dupla mutánshoz megemelkedett a szintje. Ez pedig arra utal, hogy az aktivátor E2FA és E2FB egymással ellentétes módon szabályozza a *CDKB1;1* kifejeződését.

Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy az osztódó becőben az E2FA és E2FB funkciók hiányában is kifejeződnek a sejtciklus gének, ami arra enged következtetni, hogy a sejtciklus gének aktiválódásában betöltött szerepük az embriógenezis során nem létfontosságú. A poszt-mitotikus, érési fázisú *e2fa-2/e2fb-1* mutáns becőben ugyanakkor az általunk vizsgált sejtciklus gének továbbra is bekapcsolt állapotban maradnak, ami alapján a magfejlődés érési fázisa során az E2FA és E2FB aktivátor típusú transzkripció faktorok a sejtciklus gének represszoraként működhetnek.





**12. ábra: Sejtciklus-szabályozó gének kifejeződése különböző aktivátor *e2f* mutánsokban a becőfejlődés során.**

**A,** A *CYCD3;1*, *ORC2*, *MCM3* és *CDKB1;1* sejtciklus szabályozó gének expressziója az *e2fa-2*, *e2fb-1* szimpla és *e2fa-2/e2fb-1* dupla mutáns vonalakban három becőfejlődési stádiumban (S1-3) a vad típusú kontrollal összehasonlítva. A relatív transzkript mennyiségek a vad típusú S1 állapotú becőminták expressziós szintjéhez normalizálva lettek megadva.

**B,** Az S3 érési stádiumban hasonlítottuk össze a sejtciklus szabályozó gének expressziós szintjét az *e2f* mutáns és a vad típusú minták között. A relatív transzkript mennyiségek az adott gén vad típusú S3 állapotú becőmintájának expressziós szintjéhez normalizálva lettek megadva.

A feltüntetett szórás három biológiai ismétlésből származó értékekre vonatkozik.  $P \leq 0,05$ (\*), 0,01(\*\*), 0,001(\*\*\*), 0,0001(\*\*\*\*) szignifikáns különbségnek csak az adott becőstádiumon belül, a mutáns és vad típusú minták között fogadtuk el. ns: nem szignifikáns különbség.

## **5. Az aktivátor E2F transzkripció faktorok hiányának hatása a kifejlett embriók méretére, az embrionális sejtszámra és a sejtméretre**

Korábban kimutatták, hogy a fejlődő Arabidopsis embrióban a sejtszámot az RBR aktivitása határozza meg, feltételezhetően az E2F transzkripció faktorok működésének befolyásolásán keresztül (Gutzat és mtsai., 2011; Nowack és mtsai., 2012). Nem ismert ugyanakkor, milyen hatással van az embrionális sejtszámra az aktivátor E2F transzkripció faktorok hiánya. Az aktivátor E2F-ek szerepének megfigyeléséhez teljesen érett embriókat izoláltunk mind vad típusú kontroll, mind pedig *e2fa-2* és *e2fb-1* szimpla, valamint *e2fa-2/e2fb-1* dupla mutánsokból, majd meghatároztuk az embrionális levél, és szár valamint az őket alkotó sejtek méretét konfokális lézer scanning mikroszkóp alatt PI festést követően (13. ábra). Az *e2fa-2* mutáns embrió méretében a vad típusú embrióhoz hasonló, míg az *e2fb-1* mutáns embrió inkább valamivel nagyobb volt annál (pontosan 1,2-szeres növekedést figyeeltünk meg). Az *e2fb-1* mutáns embrió levele több, de kisebb sejtet tartalmazott, mint a vad típusú. Az *e2fa-2/e2fb-1* dupla mutáns embriók lényegesen nagyobbak voltak, mint a vad típusú embriók, az embrionális levelük és száruk is jelentősen megnagyobbodott. Habár az *e2fa-2/e2fb-1* mutáns embrionális sejtek száma gyakorlatilag megegyezett a vad típusú embrionális sejtek számával, az *e2fa-2/e2fb-1* mutáns sejtek mérete jelentősen megnőtt, mind az embrionális levélben, mind az embrionális szárban. Az *e2fa2/e2fb-1* mutáns jellemzése során megfigyeltük, hogy a mutáns növényeken a kontroll növényekhez képest rövidebb becők fejlődnek, amelyek kevesebb számú, de nagyobb méretű és súlyosabb magokat tartalmaznak, mint a vad típusú becők (9. táblázat). Mindezek alapján a dupla *e2fa-2/e2fb-1* növények csökkent termékenységgel rendelkeznek, a rövidebb becőkben kevesebb, de nagyobb magokat találtunk (Függelék 30. ábra).

Genotípus	Magok súlya*	Teljes magtömeg (mg)**	Becők hossza (cm)***	Becők száma****	Magok száma becőnként	Magok mérete (mm <sup>2</sup> )
Vad típus	2,2 ± 0,1	370 ± 60	1,6 ± 0,1	47 ± 2,5	57 ± 5,7	0,182 ± 0,015
<i>e2fa-2</i>	2,17 ± 0,05	332 ± 59	1,5 ± 0,1	48 ± 4,2	53 ± 3,9	0,187 ± 0,015
<i>e2fb-1</i>	2,36 ± 0,11	383 ± 61	1,7 ± 0,1	51 ± 4,1 <sup>A</sup>	56 ± 8,9	0,205 ± 0,017 <sup>C</sup>
<i>e2fa-2/e2fb-1</i>	3,0 ± 0,11 <sup>B</sup>	267 ± 48 <sup>B</sup>	1,1 ± 0,2 <sup>C</sup>	56 ± 4,4 <sup>C</sup>	22 ± 3,1 <sup>D</sup>	0,221 ± 0,017 <sup>D</sup>

**9. táblázat: Az *e2fa-2/e2fb-1* dupla mutáns növények kevesebb, de nagyobb és súlyosabb magokkal rendelkeznek, mint a vad típusú kontroll növények.**

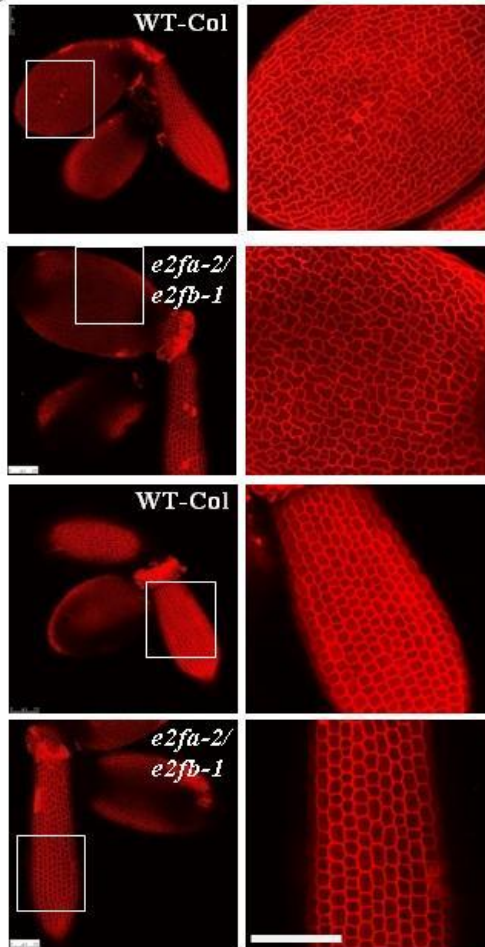
A növényeket azonos körülmények között neveltük. Az év eltérő időszakában történő ismétlés ugyanazt az eredményt adta. A szórást ± jelöltük. \*A magok súlyát mg-ban adtuk meg 100 magra vonatkoztatva (n=10/vonal).

\*\*A teljes magtömeget a begyűjtött magok súlyának megméréseivel határoztuk meg (n=10/vonal) és mg-ban adtuk meg. A becőhossz (\*\*\*) és a becőszám (\*\*\*\*) meghatározásához az elsődleges virágzatot használtuk (n=10/vonal; N=50-70). P≤0,05(<sup>A</sup>), 0,01(<sup>B</sup>), 0,001(<sup>C</sup>), 0,0001(<sup>D</sup>) szignifikáns különbségnek csak a megfelelő mutáns és vad típusú minták között fogadtuk el. A nem jelölt értékek esetében nincs szignifikáns különbség.

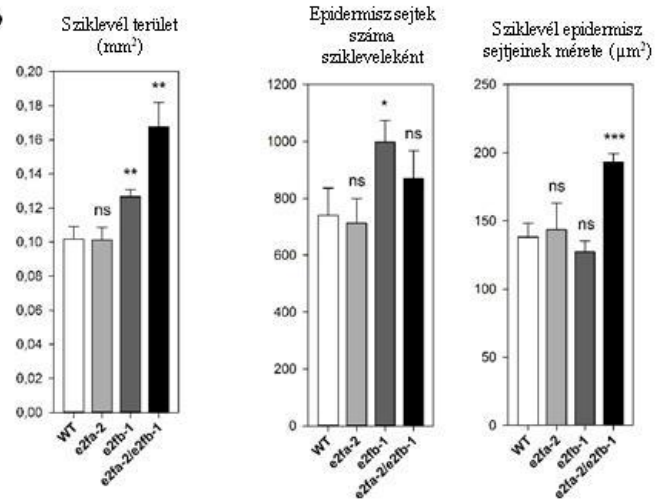
A,



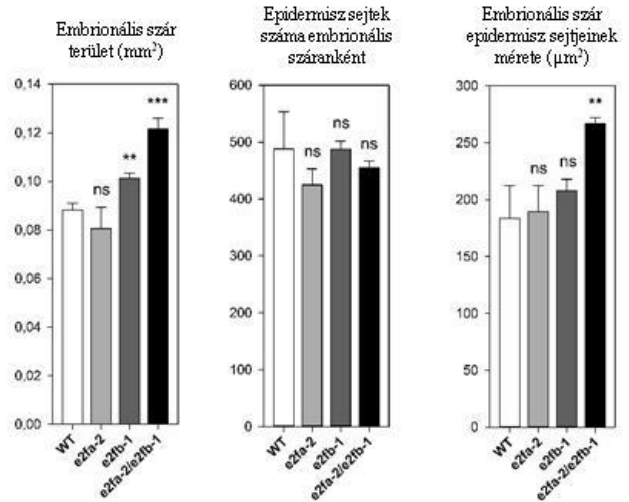
B,



C,



D,



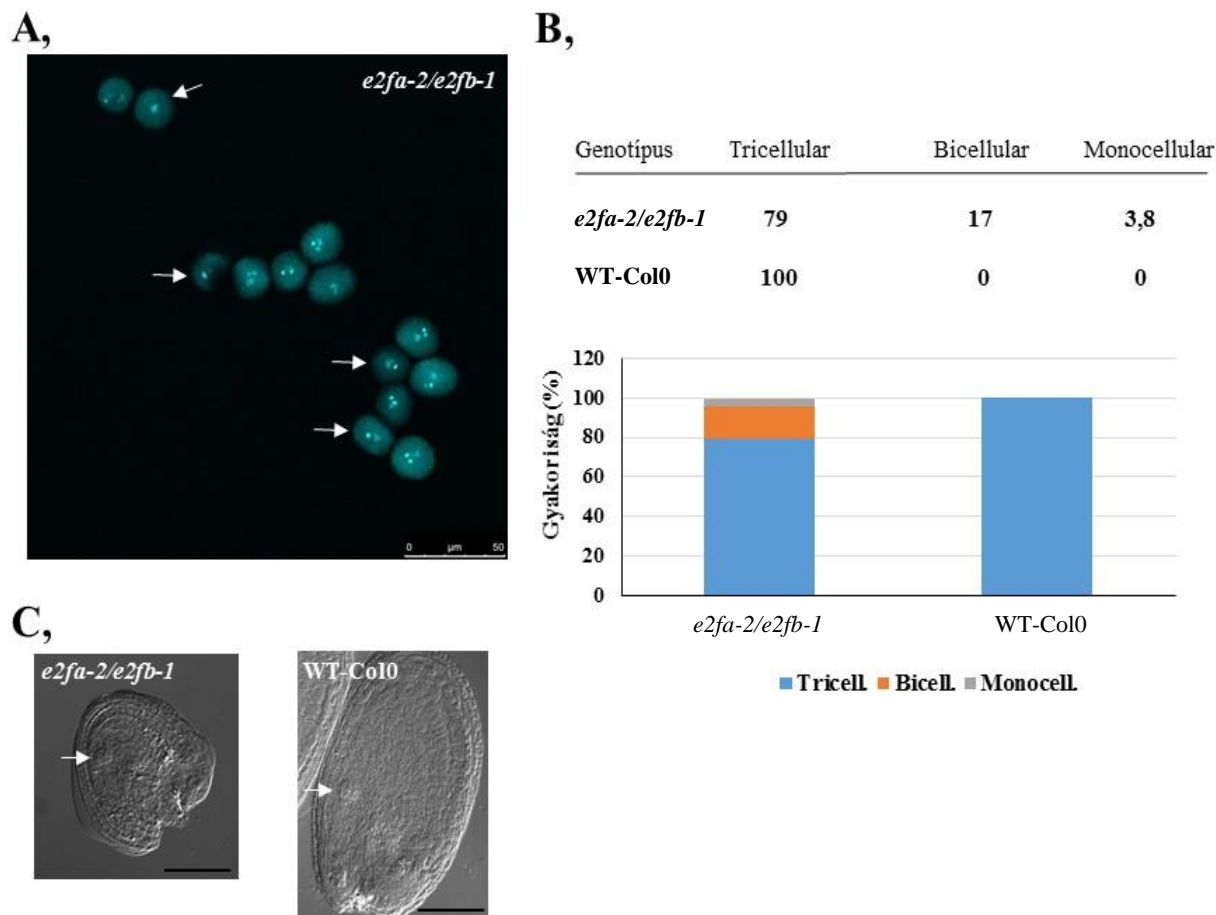
### 13. ábra: Az E2FA és E2FB transzkripciós faktorok szerepe elhanyagolható az embriionális sejtosztódások során.

A, Konfokális lézer scanning mikroszkóppal készített képek vad típusú, valamint *e2fa-2*, *e2fb-1* szimpla és *e2fa-2/e2fb-1* dupla mutánsok kiszáradt magjaiból izolált érett embriókról. A méret vonal 100 µm-t mutat.

B, PI festett vad típusú és *e2fa-2/e2fb-1* dupla mutáns érett embriók konfokális lézer scanning mikroszkóppal fotózva. Fehér négyzetekkel vad típusú és *e2fa-2/e2fb-1* dupla mutáns sziklevélen és embriionális száron található epidermális régiókat jelöltünk. Kinagyítva láthatók az epidermális sejtek a képek jobb oldalán. A méret vonal 100 µm-t mutat.

**C-D**, Kiszáradt magokból preparált érett embriók teljes sziklevelel (**C**) és embrionális szár (**D**) területét meghatároztuk. Három biológiai ismétlésből származnak az értékek, ahol ismétlésenként 10 mintán végeztük el a méréseket. A sejtméretet és a sejtszámot az Image J program segítségével határoztuk meg. A hibásávok a szórást jelölik.  $P \leq 0,05$  (\*), 0,01 (\*\*), 0,001 (\*\*\*) szignifikáns különbségnek csak a megfelelő mutáns és vad típusú minták között fogadtuk el. ns: nem szignifikáns különbség.

A csökkent termékenység hátterében az ivarsejtképződés hibája is állhat. Éppen ezért konfokális lézer scanning mikroszkóp alatt megvizsgáltuk az *e2fa-2/e2fb-1* dupla mutáns érett pollenszemeit DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) festést követően. Ennek során olyan pollenszemeket figyelhettünk meg, ahol a generatív sejtek száma a normálistól eltért, ami megerősítette ezt a feltételezésünket. Az éretlen *e2fa-2/e2fb-1* mutáns magokban a gyengén fejlődő endospermium is a kettős megtermékenyítés hiányára enged következtetni (14. C ábra). A hím ivarsejtek képződéséhez tehát szükség van az aktivátor E2F-ek szerepére. Az *e2fa-2/e2fb-1* maghozama 30 %-al elmarad a vad típus maghozamához képest, magjaik tömege viszont 36 %-al növekedett, mint a vad típusú magoké. Ez negatív korrelációt jelez a teljes maghozam és a magok átlagos súlya között (9. táblázat). A nagyméretű mag és nagyméretű embrió fenotípus az *e2fa-2/e2fb-1* dupla mutánsban annak a következménye lehet, hogy a növény kevesebb mag között osztja el az anya növénytől kapott tápanyagokat (Ohto és mtsai., 2005). Mindazonáltal eredményeink azt mutatják, hogy az *e2fa-2/e2fb-1* dupla mutáns embriók az aktivátor E2F funkciók hiányában ugyanannyi, de nagyobb sejttel rendelkeznek, mint a vad típusú embriók. Ezek az eredményeink alátámasztják azt a megállapításunkat, miszerint az aktivátor E2F-ek szerepe nem nélkülözhetetlen az embrionális sejtosztódáshoz.



#### 14. ábra: Abnormális pollen és magfejlődés az *e2fa-2/e2fb-1* mutánsban.

**A,** 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) festett érett *e2fa-2/e2fb-1* mutáns pollenszemek konfokális lézer scanning mikroszkópiás felvétele. Nyilak jelzik a mutáns pollenszemeket, ahol nincs vagy csak egy generatív sejt van.

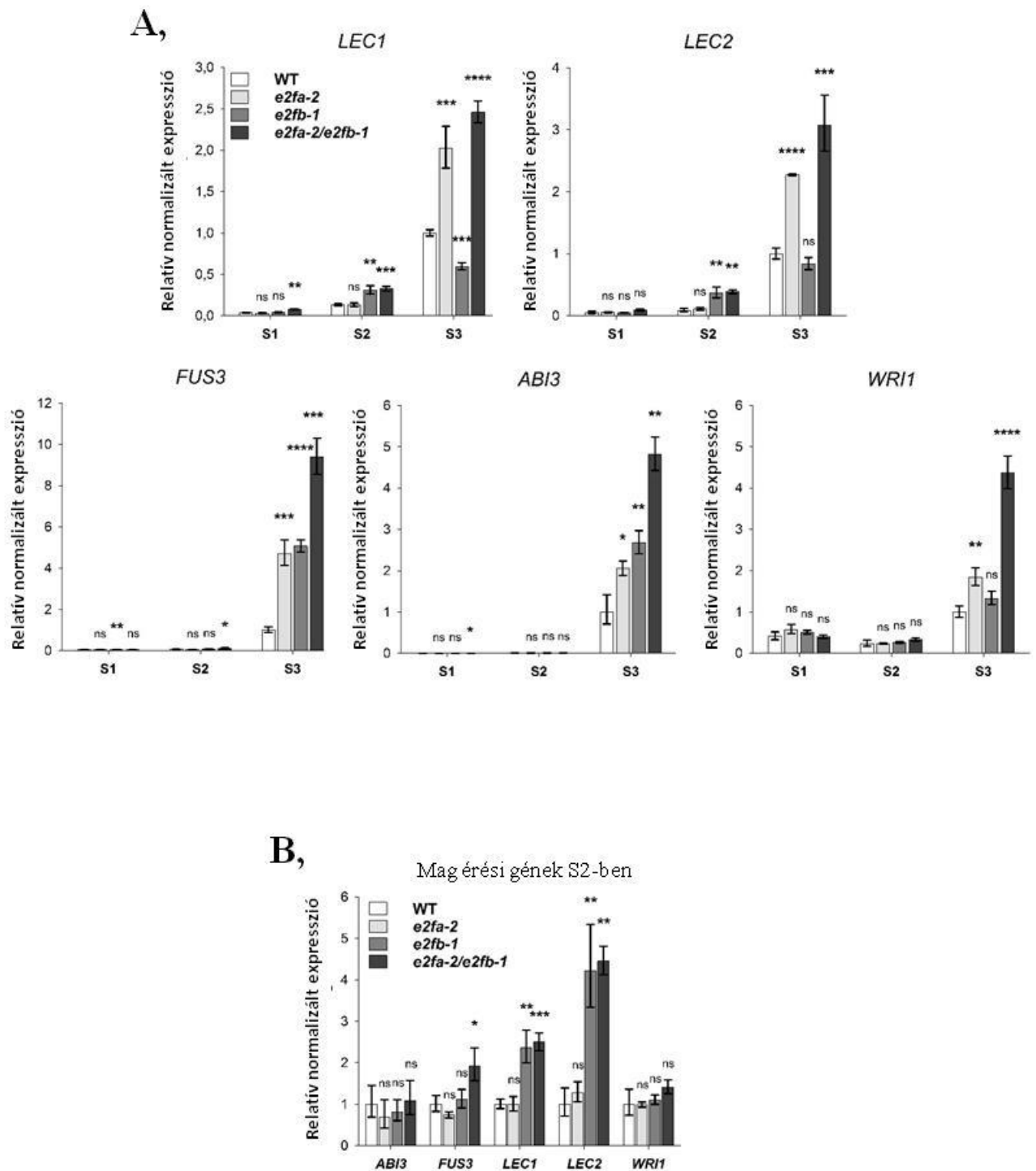
**B,** A mutáns pollenszemek gyakorisága (N=200). Tricellular (háromsejtes), bicellular (kétsejtes) és monocellular (egysejtes) pollenszemek gyakorisága.

**C,** Reprezentatív mikroszkópiás (Cell-R mikroszkóp) felvétel az endospermium alul fejlettségére az *e2fa-2/e2fb-1* dupla mutánsban összehasonlítva a kontroll vad típusú hasonló korú éretlen maggal (fehér nyilak a globuláris embriót jelzik). Méret skála 50  $\mu$ m.

## 6. Az E2FA és E2FB transzkripciós faktorok gátolják a magérési gének AFL családjának kifejeződését

Korábban kimutatták, hogy a *LEC2* és az *ABI3* magérési gének expressziója megemelkedik azokban az Arabidopsis csíranövényekben, ahol az RBR szintjét géncsökkentés által csökkentették. A *LEC2* gén a promóterében található E2F kötőhely alapján egy feltételezett E2F célgén, habár az RBR direkt kötődését a *LEC2*-höz nem tudták kimutatni (Gutzat és mtsai.,

2011). Az aktivátor E2F-ek szerepének megértése céljából újabb génexpressziós vizsgálatot végeztünk a becő és mag fejlődése során. Megvizsgáltuk a *LEC2*, a *LEC1*, a *FUS3*, az *ABI3* és a *WR11* gének génexpressziós mintázatát a becőfejlődés során (S1-S3) szimpla és dupla *e2f* mutáns Arabidopsis vonalakban (15. A ábra). Ahogyan azt várhattuk, a vad típus esetében az érési gének még nehezen detektálhatóak az osztódó becőkben (S1), expressziójuk megemelkedik az átmeneti stádiumban (S2) és csúcsértéket az érési fázisban (S3) éri el. Az érési fázisban (S3) az összes vizsgált érési gén expressziója megemelkedett az *e2fa-2* mutánsban és egy részük az *e2fb-1* mutánsban is. A *LEC1* és *LEC2* expressziója kizárólag az E2FA transzkripció faktor hiányában emelkedett meg, míg a *FUS3*, *ABI3* és bizonyos mértékben a *WR11* expressziója nem csak az E2FA, hanem az E2FB transzkripció faktor hiányában is megemelkedett. Ezeknek a géneknek az expressziója a dupla *e2fa-2/e2fb-1* mutánsban tovább emelkedett, azaz mind az E2FA mind pedig az E2FB negatívan szabályozza az érési géneket az S3 fázisú becőkben. A *LEC1* és *LEC2* gének expressziója az *e2fb-1* mutánsban is megemelkedett, de kizárólag az átmeneti fázisban (S2, 15. B ábra). Ez alapján a két aktivátor E2F különböző fejlődési stádiumban szabályozza az ún. korai érési *LEC1-2* gének expresszióját.



**15. ábra: Az aktivátor E2F transzkripciós faktorok gátolják a magérési gének AFL családját a becőfejlődés során.**

**A,** Az *e2fa-2*, *e2fb-1* és *e2fa-2/e2fb-1* szimpla és dupla mutánsok fejlődő becőiben qPCR reakció segítségével mért *LEC1*, *LEC2*, *FUS3*, *ABI3* és *WR11* transzkripciós szintek összehasonlítása a vad típusú kontrollban mért mRNS szintekkel három becőfejlődési stádiumban (S1-S3). A relatív transzkript mennyiségek az S3 stádiumú, vad típusú minta expressziós szintjéhez normalizálva lettek megadva.



**B**, Magérii gének expressziós szintje az *e2f* mutáns és vad típusú mintákban az S2 átmeneti állapotban. A relatív transzkripció mennyisége az adott gén vad típusú S2 stádiumú becőmintájának expressziós szintjéhez normalizálva lettek megadva.

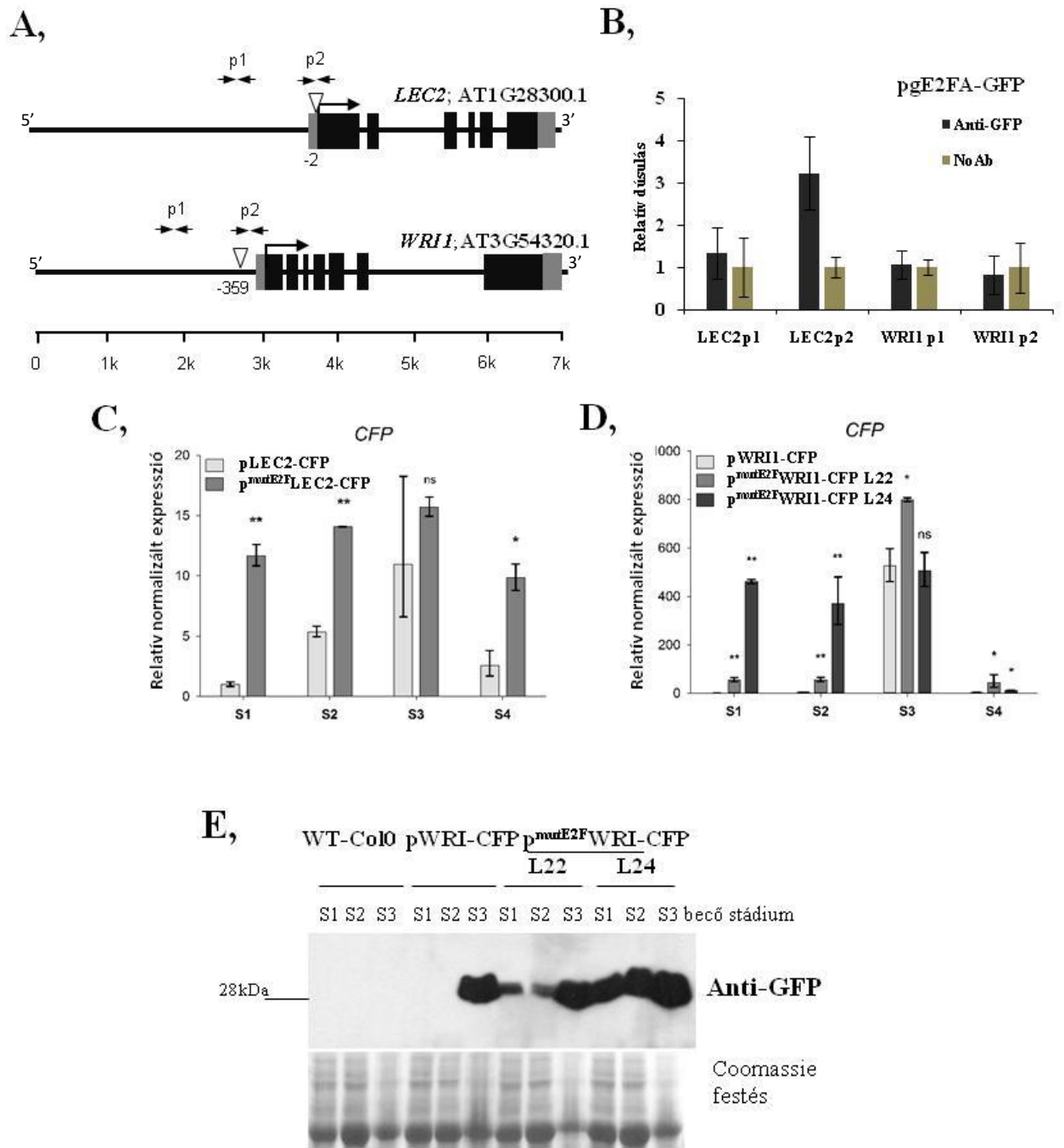
A feltüntetett szórás három biológiai ismétlésből származó értékekre vonatkozik.  $P \leq 0,05$ (\*), 0,01(\*\*), 0,001(\*\*\*), 0,0001(\*\*\*\*) szignifikáns különbségnek csak az adott becőstádiumon belül, a mutáns és vad típusú minták között fogadtuk el. ns: nem szignifikáns különbség.

## **7. Az E2F transzkripció faktorok szerepe az érési *WRI1* és *LEC2* gének expressziójában a becőfejlődés során**

A *LEC2* és *WRI1* transzkripció faktorok promóter régiójában E2F kötő helyet tudtunk kimutatni, ami alapján feltételezhetően az E2F-ek közvetlenül szabályozzák a kifejeződésüket (16. A ábra; Függelék 33. ábra). Annak érdekében, hogy ezt kiderítsük kromatin-immunprecipitációs (ChIP) kísérletet végeztünk el. Ehhez anti-GFP ellenanyagot használtunk, mintaként pedig a pgE2FA-GFP és pgE2FB-GFP transzgenikus *Arabidopsis* vonalak érett becőit (S3) használtuk fel (Magyar és mtsai., 2012; Ószi és mtsai., 2020). Az anti-GFP ChIP-et követően az E2FA-GFP becőkben kimutatható volt a kölcsönhatás a *LEC2* promóterével, de a *WRI1* promóterével már nem. Az E2FB esetében nem detektáltunk kölcsönhatást egyik promóterrel sem (függelék 31. ábra). Az E2FA-GFP kötődése a *LEC2* promóteren arra a régióra esett, ahol az E2F kötőhely található (16. B ábra). Eredményeink alapján, az E2FA transzkripció faktor közvetlenül szabályozhatja a *LEC2* gén expresszióját a magfejlődés érési fázisa alatt. Ez az eredmény ugyanakkor nem zárja ki annak a lehetőségét, hogy más E2F faktorok, mint például az E2FC közvetlenül szabályozza az érési fázisban szerepet játszó gének működését, vagy más E2F transzkripció faktorok a magfejlődés korábbi stádiumában játszanak szabályozó szerepet.

Annak érdekében, hogy még nagyobb bizonyosságot szerezzünk az E2F-ek szerepéről a *LEC2* és *WRI1* gének szabályozásában a magfejlődés során, elrontottuk a *LEC2* és a *WRI1* gének promóterében található E2F kötőhelyeket (16. A ábra; Függelék 33. ábra; részletesebben lásd Anyag és Módszerek rész). Transzgenikus riporter vonalakat hoztunk létre az intakt és az E2F-kötésre alkalmatlan, mutáns *LEC2* és *WRI1* promóerekkel, amelyek a fluoreszcens CFP (cián fluoreszcens fehérje) fehérjét expresszálták. Kísérleteinkhez reprezentatív vonalak kerültek kiválasztásra, amelyekről becőmintákat gyűjtöttünk a már korábban leírt módon, a különböző fejlődési állapotok szerint (S1-S4). Kvantitatív PCR (qPCR) reakció segítségével vizsgáltuk meg a riporter vonalakban a CFP expressziót. Az intakt *LEC2* riporter vonal (p*LEC2*-CFP) expressziós mintázata megegyezett az endogén *LEC2* gén expressziós mintázatával. A

legkorábbi magfejlődési állapotban (S1) szinte alig volt detektálható CFP expresszió, amely aztán az átmeneti állapotban (S2) növekedésnek indult, majd az érési fázisban (S3) elérte maximumát, az érés utáni nyugalmi fázisban pedig lecsökkent (S4). Ezzel ellentétben az E2F kötőhelyben mutáns LEC2 riporter vonal ( $p^{\text{mutE2F}}$ LEC2-CFP) expressziója szinte végig egyöntetűen magas szintű volt a teljes becőfejlődés során (16. C ábra). A natív WRI1 riporter vonal expressziója a LEC2-höz hasonlóan hűen követte az endogén *WRI1* gén expressziós mintázatát és expressziójának maximumát az érési fázisban (S3) érte el. Munkánk során két különböző E2F kötőhely mutáns WRI1 riporter vonal expressziós mintázatát is megvizsgáltuk ( $p^{\text{mutE2F}}$ WRI1-CFP, 22-es és 24-es vonal). Mindkét riporter vonal becőiben már az érés előtti korai fejlődési állapotokban (S1-S2) expresszáldott, bár a 24-es vonal nagyobb mértékben, mint a 22-es (16. D ábra). A WRI1 riporter vonalak esetében Western-blottal is nyomon követtük a CFP fehérje mennyiségében bekövetkező változásokat a becőfejlődés során (S1-S3; 16. E ábra). Az intakt WRI1 riporter vonal esetében a CFP nagy mennyiségben halmozódott fel, de kizárólag az érési fázisban, míg a CFP fehérje az E2F-kötésben mutáns WRI1 riporter vonal esetében már a korábbi becőfejlődési stádiumokban is kimutatható volt. Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy az érési gének működését az E2F transzkripciós faktorok a mag érési fázisára korlátozzák.



**16. ábra: Az E2F transzkripciós faktorok szabályozzák a *LEC2* és *WR11* gének időbeli kifejeződését a magfejlődés során.**

**A,** A *LEC2* és *WR11* gének vázlatos ábrázolása. A p1 és p2 jelölésű nyílak a qPCR során használt primer párok helyét jelölik. A feltételezett E2F kötőhelyeket fehér nyílhegygel jelöltük, távolságukat a start kodontól (ATG) ábrázoltuk. A szürke téglalap a startkodontól felfelé (upstream) 5' irányban a nem transzlálódó régiót (angolul UTR), míg a startkodontól lefelé (downstream), a 3' irányban található UTR-t jelöli. A fekete téglalapok az exonokat, míg a téglalapok közötti fekete vonalak az intronokat jelölik. k=kilo bázispár

**B,** A kromatin immunprecipitációt (ChIP) 6-10 napos zöld, fejlődő becőkből izolált kromatinon végeztük el. A minták a pgE2FA-GFP transzgenikus vonalról származtak, és nyúlban termeltetett anti-GFP ellenanyagot

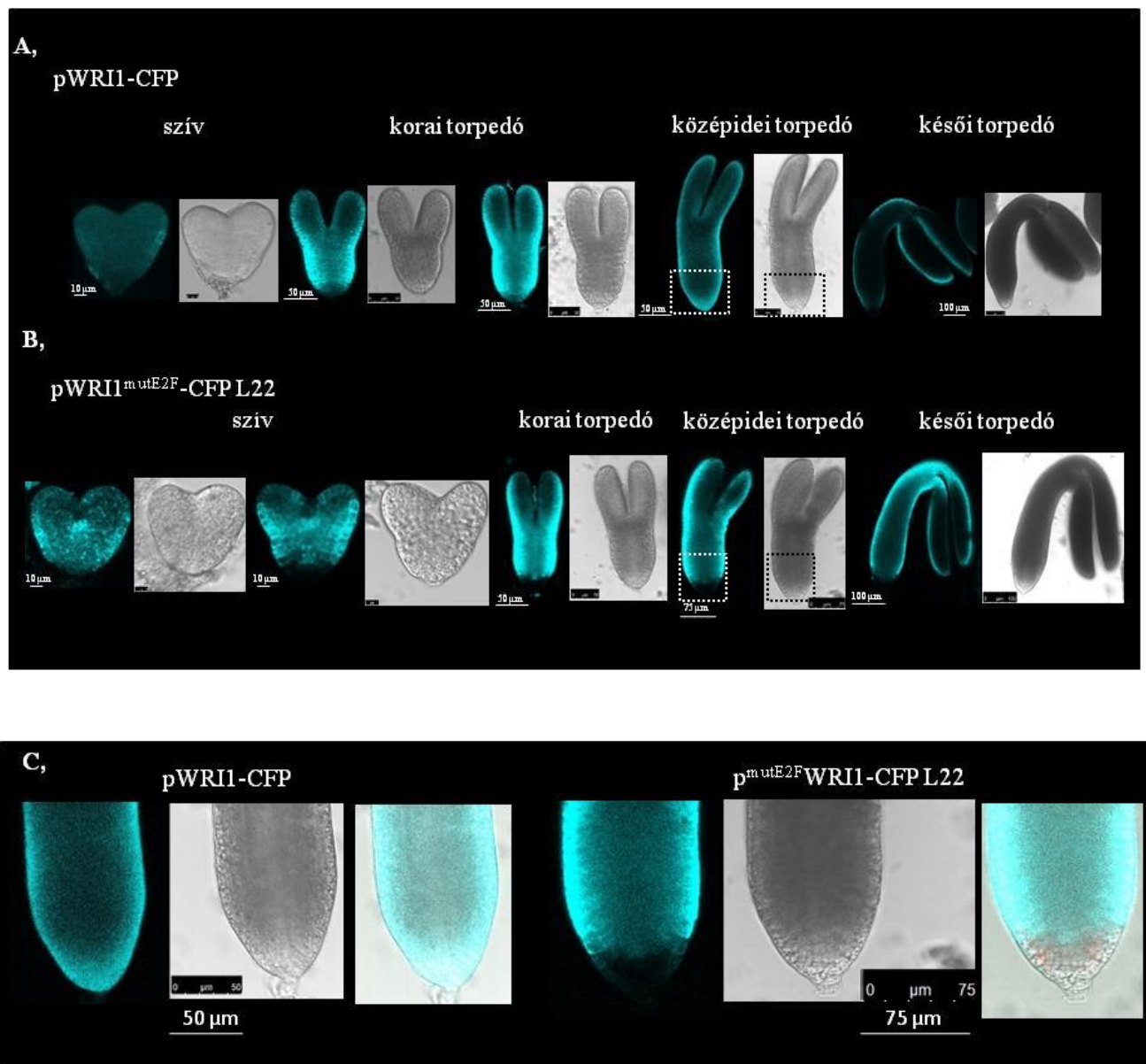
használtunk. A ChIP-et qRT-PCR analízis követte. Az ábrán a reprezentatív kísérlet eredménye látható három biológiai ismételtsből származó értékekkel. A statisztikai analízishez a Mann-Whitney-próbát használtuk. NoAb: antitest nélküli kontroll minta (Dr. Papdi Csaba munkája alapján).

**C-D,** Az intakt (pLEC2-CFP; pWRI1-CFP) és E2F kötőhely mutáns promóterekkel (p<sup>mutE2F</sup>LEC2-CFP; p<sup>mutE2F</sup>WRI1-CFP) rendelkező LEC2 (**C**) és WRI1 (**D**) riporterek expresszióját a különböző becőfejlődési állapotokban (S1-4) qRT-PCR analízissel állapítottuk meg. Az L22 és L24 jelölés két független E2F kötőhely mutáns promóter vonalat jelent (**D**).

A relatív transzkript mennyiségek az intakt promóterrel rendelkező konstrukció S1 stádiumú becőmintájának expressziós szintjéhez normalizálva lettek megadva. A feltüntetett szórás három biológiai ismételtsből származó értékekre vonatkozik.  $P \leq 0,05$  (\*),  $0,01$  (\*\*) szignifikáns különbségnek csak az adott becőstádiumon belül, az intakt és mutáns promóterrel rendelkező konstrukciók mintái között fogadtuk el. ns: nem szignifikáns különbség.

**E,** A CFP fehérje szintet Western blot segítségével követtük nyomon a becőfejlődés során (S1-S3) a **D**, pont transzgenikus vonalaiban. A vizsgálathoz anti-GFP ellenanyagot használtunk. A CFP fehérje molekulásúlyát (28 kDa) az ábra bal oldalán tüntettük fel. A különböző fejlettségi állapotú becő minták fehérjéit Coomassie festésével tettük láthatóvá a membránon.

A LEC2 riporter vonallal ellentétben a WRI1 riporter vonalakban a CFP jel elég erős volt ahhoz, hogy a fejlődő embriókban konfokális lézer scanning mikroszkóp alatt is detektálhassuk. Korábbi eredményeinket megerősítette, hogy a WRI1 riporter vonal CFP jelét a szív állapotú embrióban nehezen lehetett detektálni. A legerősebb CFP jelet az érési fázisban, a korai torpedó embrió állapotban láttuk, majd fokozatosan gyengült az érés során, és teljesen lecsökkent az érett embrióban. Ezzel ellentétben mindkét az E2F kötőhelyben mutáns WRI1 riporter vonalban erős CFP jelet detektáltunk már a szív állapotú embrióban, a jel erőssége pedig fennmaradt egészen a késői torpedó embrió állapotig (17. A,B ábra, Függelék 32. ábra). Megfigyeltük, hogy míg az intakt WRI1 riporter vonal esetében a CFP jel a teljes embrióban detektálható volt, addig az E2F kötőhelyben mutáns WRI1 riporter vonalnál a CFP jel hiányzott az éretlen embriók gyökércsúcsából (17. C ábra). Ez alapján az E2F transzkripció faktorok nem csak időben, hanem térben is szabályozzák a *WRI1* expresszióját az embriófejlődés során.



**17. ábra: A WRI1 transzkripciós faktor embrió-specifikus megjelenését az E2F transzkripcionális szabályozók kontrollálják.**

**A-B,** Éretlen magokból izolált fejlődő embriókról konfokális lézer scenning mikroszkóppal készült reprezentatív képek, melyek az intakt (**A**) és E2F kötőhelyben mutáns (**B**) WRI1 promótereket tartalmazzák (pWRI1-CFP és p<sup>mutE2F</sup>WRI1-CFP riporter vonalak).

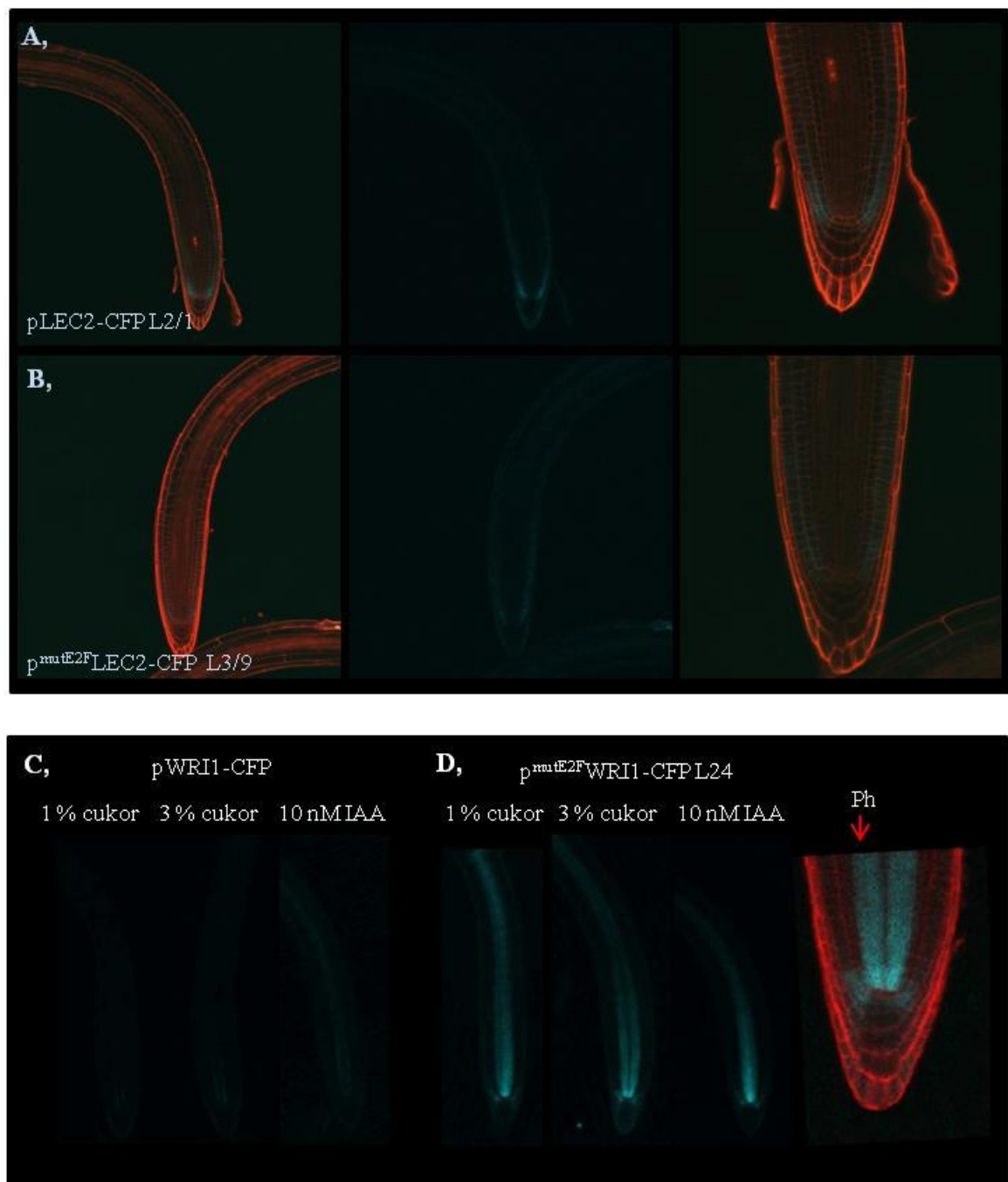
**C,** Középidei torpedó állapotú embrió embrionális gyökércsúcs régióját fehér szaggatott vonallal jelöltük az **A**, és **B**, ábrákon, melyek a **C**, ábrán kinagyítva láthatóak.

A CFP jel kék színnel látható. Az embriókról készült ábrák tartalmazzák a méretskálát.

## 8. Az embrionális *WRI1* és *LEC2* gének a fiatal csíranövények gyökerében is kifejeződnek és az E2F transzkripció faktorok szabályozása alatt állnak

A *LEC2* kifejeződése kizárólagosan, míg a *WRI1* expressziója dominánsan az embriófejlődésre korlátozódik, de gyengébben a gyökérben is detektálták (eFP browser – Winter és mtsai., 2007). A legújabb eredmények alapján azonban a *LEC2* is szerepet játszik a gyökérfejlődésben (Tang és mtsai., 2017). Kíváncsiak voltunk, vajon a riporter vonalaink segítségével ki tudjuk-e mutatni a *LEC2* és a *WRI1* expresszióját a gyökérben is. Fiatal, egy hetes transzgenikus csíranövények gyökerét vizsgáltuk meg konfokális lézer scanning mikroszkóp segítségével (18. ábra). Az intakt *LEC2* riporter vonal (p*LEC2*-CFP) CFP jele a gyökér összejt régiójában jellegzetes mintázatot mutatott. Expressziója a proximális gyökérmerisztémán belül az epidermisz és kortex sejtekben volt megfigyelhető. A legerősebb CFP jelet közvetlenül a QC (quiescent centre: nyugvó centrum) melletti kortex, endodermisz és epidermisz iniciális sejtekben detektáltuk, majd a fluoreszcens jel, a hajtás irányában felfelé gyengült és néhány sejttel távolabb a QC sejtektől már gyakorlatilag kimutathatatlan volt. Az E2F kötőhelyben mutáns *LEC2* riporter (p<sup>mutE2F</sup>*LEC2*-CFP) esetében sokkal gyengébb jelet detektáltunk, elsősorban közvetlenül a QC melletti iniciálisokban (18. A,B ábra). Több párhuzamos E2F-kötésben mutáns vonalban is hasonlóan gyengébb jelet detektáltunk a kontrollhoz képest, ami alapján úgy véljük, hogy az E2F-ek a *LEC2* gén működésében ellentétes szerepet játszanak a gyökérben (aktivátor funkció) és az embrióban (represszor funkció). A natív *WRI1* riporter legerősebb CFP jelet közvetlenül a QC melletti sejtekben, az ún. iniciálisokban mutatta, valamint a szállító szövet floém (háncs) sejtjeiben, de kizárólag a gyökér merisztéma központi részében (18. C ábra). Az intakt *WRI1* riporter vonalhoz képest az E2F-kötő szekvenciában mutáns *WRI1* riporter vonalunk gyökerében látványosan erősebb CFP jelet detektáltunk mind a QC körüli sejtekben, mind pedig a szállítószövet sejtjeiben és ez megmaradt a központi merisztematikus sejtektől a hajtás irányába távolodva is (18. D ábra). Korábbi eredmények alapján a *WRI1* expressziója cukorral indukálható, ezért megemeltük a csírázási médium cukortartalmát 1 %-ról 3 %-ra és ilyen körülmények között növesztettük őket függőleges lemezeken (Masaki és mtsai., 2005). Megállapíthattuk, hogy az intakt *WRI1*-riporter valóban mutat némi cukor indukciót a gyökérben, amit a mutáns promóter esetében már nem láttunk. Mivel a *WRI1* riporter expressziója a gyökérmerisztémán belül főként a QC körül jelent meg, és az auxinnak fontos szerepe van a gyökérmerisztéma fenntartásában, auxin tartalmú (10 mM IAA) függőleges lemezeken is növesztettünk *WRI1* riportereket tartalmazó növényeket (Benett and Scheres, 2010). Az auxin kezelés a natív promóteres változatnál a CFP jel erősödését eredményezte

elsősorban a hancsrészben és a merisztémától távolodva, míg a mutáns promóteres konstrukcióval rendelkező növények gyökerében nem okozott változást a nem kezelt, kontroll gyökerekhez képest (18. C,D ábra). Eredményeink alapján igazoltuk, hogy mind a *LEC2*, mind pedig a *WRI1* promóter expresszálódik a gyökérben, és megmutattuk, hogy mindkét embrionális gén legerősebben az ún. összejt régióban fejeződik ki, a QC körüli sejtekben és a merisztémában. Megállapíthattuk, hogy mindkét gén gyökérbeli működését szabályozhatják az E2F transzkripciós faktorok. A *WRI1* esetében az embrionális fejlődéshez hasonló módon ez a szabályozás korlátozza a gén kifejeződését. Ezzel ellentétben a *LEC2* működésében az E2F szerepe megváltozott a gyökérben az embrióhoz képest; amíg az embrióban gátolta, a gyökérben stimulálta a *LEC2* kifejeződését. Mindez arra enged következtetni, hogy az E2F szabályozás egy adott gén esetében szövet és fejlődés specifikus módon megváltozhat.



**18. ábra: A LEC2 és a WRI1 riporter vonalak gyökér-specifikus kifejeződése az E2F transzkripciós faktoroktól függ.**

**A-B,** Fiatal (egy hetes) csíranövények gyökeréről konfokális lézer scanning mikroszkóp segítségével készült reprezentatív képek, melyek az intakt és az E2F kötőhelyben mutáns riporter vonalakkal készültek (pLEC2-CFP, p<sup>mutE2F</sup>LEC2-CFP). A CFP jel kék színnel, a sejtfalak PI festése piros színnel látható. Az egyesített képeken a PI (piros) festés a CFP (kék) jellel együtt látható.

**C-D,** Fiatal (egy hetes) csíranövények gyökeréről konfokális lézer scanning mikroszkóp segítségével készült reprezentatív képek, melyek az intakt és E2F kötőhelyben mutáns riporter vonalakkal készültek (pWRI1-CFP, p<sup>mutE2F</sup>WRI1-CFP). A csíranövényeket 1 % vagy 3 % cukortartalmú vagy 10 nM IAA (indol-ecetsav; auxin) tartalmú függőleges lemezen növesztettük. A piros nyíl a gyökérben található Ph: a floém szállítószövetet jelöli. A

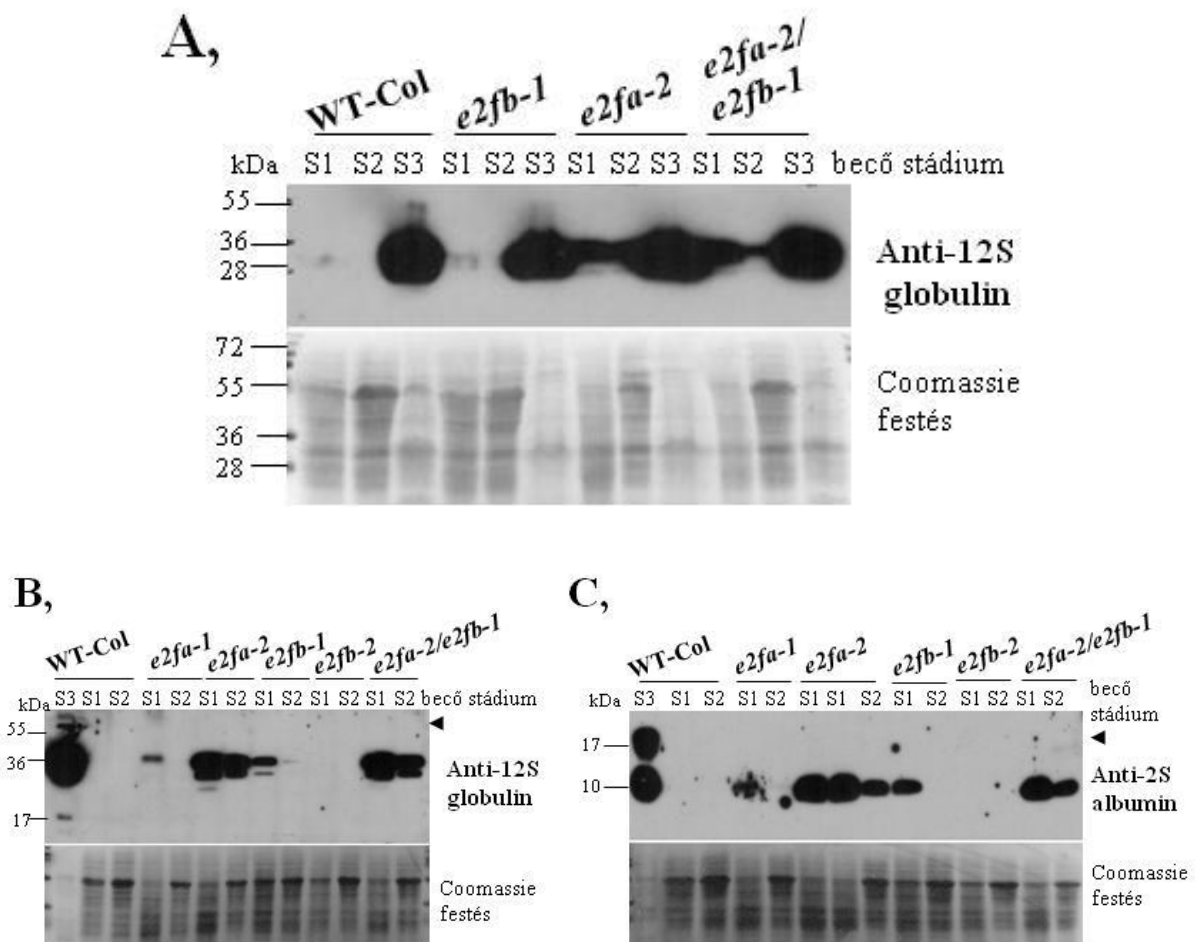


CFP jel kék színnel, a sejtfalak PI festése piros színnel látható. A kinagyított gyökércsúcsot ábrázoló képen a PI festés és a CFP jel egyesítve látható.

## **9. A mag tartalék tápanyagainak idő előtti felhalmozódása az *e2fa-2/e2fb-1* dupla mutáns vonalban**

Eddigi eredményeink alapján az E2FA és E2FB transzkripció faktorok gátolják a kulcsfontosságú magérési gének expresszióját a mag és becőfejlődés során. Ezek az eredmények arra ösztönözték munkacsoportunkat, hogy megvizsgáljuk vajon ezek az aktivátor E2F transzkripció faktorok közvetlenül szabályozni tudják-e magát a magérési programot. Az Arabidopsis magok száraz súlyának egyharmadát kétfajta tartalék fehérje teszi ki, nevezetesen a 12S globulin és a 2S albumin (ezek angolul a seed storage proteins röviden SSP; Baud és mtsai., 2002). Az aktivátor E2F-ek szerepének tanulmányozásához, specifikus ellenanyagok segítségével meghatároztuk a 2S albumin és a 12S globulin fehérjék mennyiségét Western-blot kísérletben a magfejlődés során mind a szimpla (*e2fa-2*, *e2fb-1*), mind pedig a dupla (*e2fa-2/e2fb-1*) *e2f* mutánsokban. Korábbi eredményekhez hasonlóan ezek az SSP fehérjék vad típusú becők esetében kizárólag az érési fázisban (S3) halmozódtak fel (Vicente-Carbajosa és Carbonero 2005; 19. ábra). Ezzel ellentétben az *e2f* mutánsokban már az S1 becőfejlődési állapotban megjelentek. Az *e2fa-2* szimpla és *e2fa-2/e2fb-1* dupla mutánsokban jelentősen, míg az *e2fb-1* szimpla mutánsban csak kisebb mértékben nőtt meg a mennyiségük (19. A ábra). A különbség az E2FA és E2FB mutánsok között arra engedett következtetni, hogy a két aktivátor E2F szerepe a tartalék fehérjék szabályozásában eltérhet egymástól. Ugyanakkor, azt is elképzelhetőnek tartottuk, hogy ezek az *e2f* mutánsok a T-DNS (transzfer-DNS) beépülését követően eltérő képességű mutáns fehérjékkel rendelkeznek (ezek az ún. funkcióvesztéses mutánsok) és az SSP-ék indukálódása elsősorban attól függ, hogy a különböző mutánsokban mennyire sérültek az E2F-re jellemző, specifikus funkciók. Azért, hogy ezt a kérdést eldönthessük, további E2FA és E2FB mutánsokat vontunk be a vizsgálatainkba. Az *e2fa-1* mutáns esetében a T-DNS beépülése az *e2fb-1* mutánshoz hasonlatos, azaz a Dimerizációs domén (DD) után és a Marked-box régió (MB) elé inszertálódott (20. ábra). Az *e2fa-1* és az *e2fb-1* mutánsok egymáshoz hasonló mértékben aktiválták az SSP fehérjék korai felhalmozódását, de kevésbé, mint az *e2fa-2*, amelyik a DD domén mellett, rendelkezik a MB régióval is (19. B,C ábra és 20. ábra). Az MB megerősíti a DP fehérjékhez való kötődést, és az E2F-DP közötti kapcsolódás elengedhetetlen követelménye annak, hogy az E2F transzkripció

faktor kötődni tudjon célgénjei promóteréhez (Black és mtsai., 2005; Rubin és mtsai., 2005). Az *e2fb-2* mutánsban a T-DNS inszerció a DD régióban történt, ami alapján feltételezhetjük, hogy ez a csonka E2FB fehérje már nem vagy csak gyenge kölcsönhatásra képes a DP fehérjékkel (DPA és DPB), és így feltehetően nem képes kötődni a célgénnek promóter régiójához. Ebben a mutánsban nem is figyelhettük meg az SSP fehérjék korai felhalmozódását (19. ábra). Ezek az eredményeink arra engedtek következtetni, hogy a különböző *e2fa* és *e2fb* mutánsokban eltérő képességű csonka E2F mutáns fehérjék íródhatnak át (a csonka aminosav szekvenciákat a Függelék 34. ábrája mutatja be). Specifikus E2FA és E2FB ellenanyagokkal vizsgáltuk meg ezt a kérdést (21. ábra).

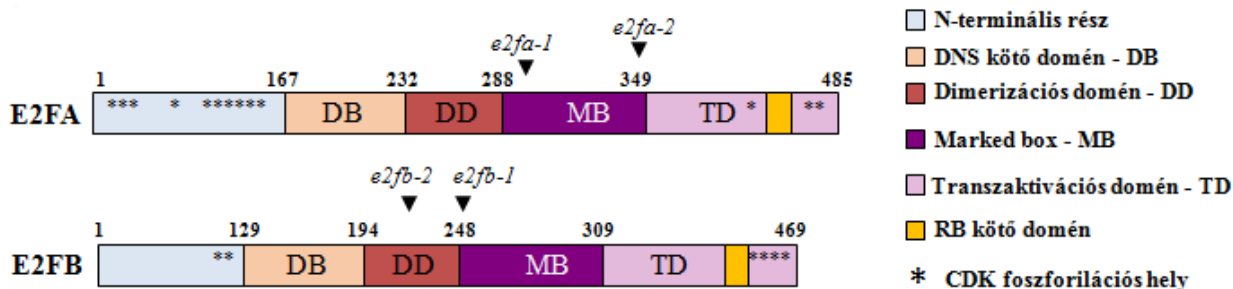


**19. ábra: Az *e2f* mutáns magok albumin (2S) és globulin (12S) tartalék fehérjeinek felhalmozódása a magok fejlődése során.**

**A,** A 12S globulin felhalmozódása a szimpla *e2fa-2*, *e2fb-1* és a dupla *e2fa-2/e2fb-1* mutáns vonalak három becőfejlődési állapotában (S1-3) összehasonlítva a vad típusú kontrollal. A kimutatást Western blot módszerével, anti-12S specifikus ellenanyag segítségével hajtottuk végre.

**B-C,** A magi tartalék fehérjék megjelenését és mennyiségét hasonlítottuk össze a korai becő és magfejlődési állapotokban (S1-S2) a különböző szimpla (*e2fa-1*, *e2fa-2*, *e2fb-1*, *e2fb-2*) és dupla (*e2fa-2/e2fb-1*) *e2f* mutáns vonalakban. A Western blot analízisben anti-12S és anti-2S antitesteket használtunk. Pozitív kontrollként a vad típusú érő becő mintát (S3) használtuk és az S1-S2 mintákhoz képest ¼ mennyiségben vittük fel a fehérje gélre (5µg). A nyílhegyek a 12S globulin és 2S albumin fehérjék még éretlen formáit (prekurzorait) jelölik.

Specifikus anti-12S globulin és anti-2S albumin antitesteket használtunk a Western blot során. A különböző fejlettségi stádiumú becőminták fehérjeit az immunoblot membránon Coomassie blue festéssel tettük láthatóvá (Dr. Magyar Zoltán munkája alapján).

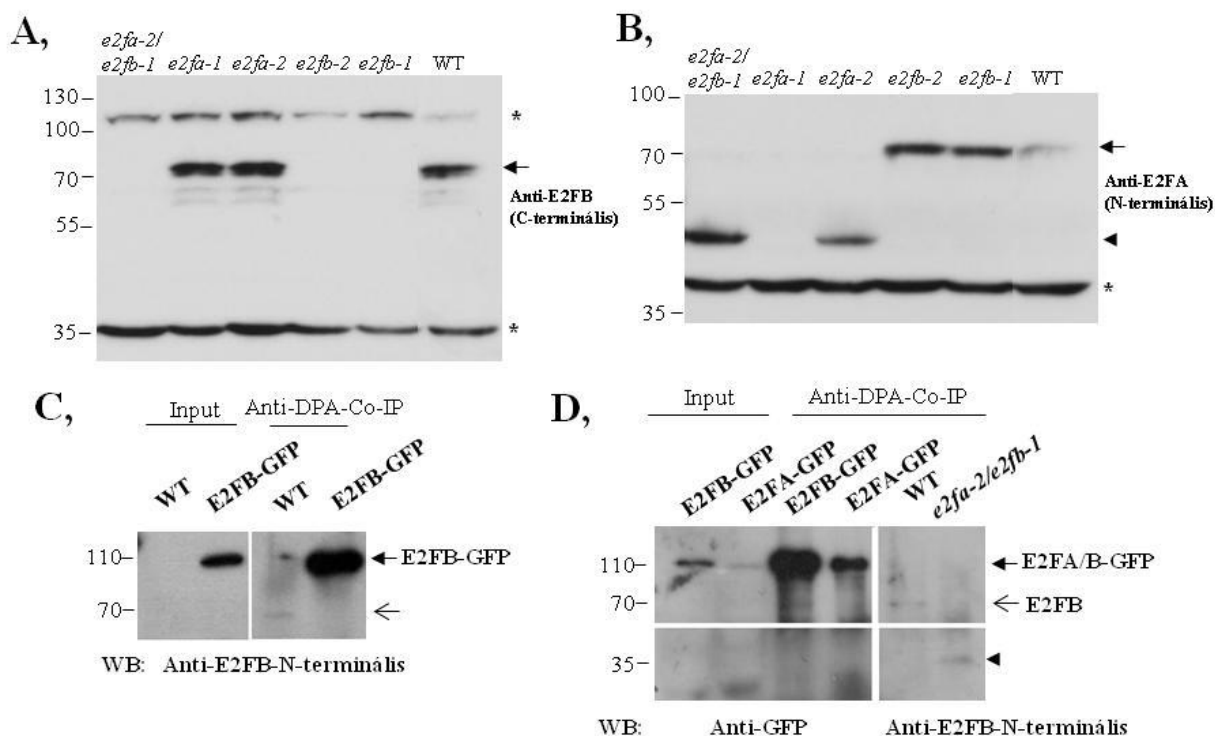


**20. ábra: Az E2FA és E2FB fehérjék szerkezeti felépítése és a T-DNS beépülése okozta funkcióvesztések.**

Az aktivátor E2F fehérjék konzervált funkcionális régióit különböző színekkel jelöltük. A nyílhegyek a különböző T-DNS inszerciók (*e2fa-1*, *e2fa-2*, *e2fb-1*, *e2fb-2*) beépülési helyére mutatnak. A számok aminosavak pozícióját jelzik.

Az E2FB C-terminálisát felismerő ellenanyag segítségével megállapítottuk, hogy sem teljes hosszúságú E2FB fehérje, sem csak a C-terminálisat tartalmazó csonka E2FB fehérje nem termelődik az *e2fb-1* és *e2fb-2* mutánsokban (21. A ábra). A csonka fehérje létezésének kimutatását N-terminális specifikus E2FB ellenanyaggal végeztük el. Ez az ellenanyag a túltermeltetett E2FB-GFP-t felismeri, viszont az endogén E2FB fehérjét csak a DPA-val való immunoprecipitáció után tudtuk kimutatni (ún. co-IP). Ehhez hasonlóan a DPA specifikus ellenanyaggal történő immunoprecipitációt követően a csonka E2FB fehérjét is ki tudtuk mutatni az *e2fa-2/e2fb-1* dupla mutánsban (21. C,D ábra). Az E2FA azonosításához egy N-terminális specifikus E2FA ellenanyagot használtunk, amely segítségével sikeresen azonosítottuk a teljes hosszúságú E2FA fehérjét a vad típusban, és az *e2fb-1* és *e2fb-2* mutánsokban is, valamint egy kisebb méretű fehérjét az *e2fa-2* szimpla és az *e2fa-2/e2fb-1* dupla mutánsban (21. B ábra). Ugyanez a csonka E2FA fehérje az *e2fa-1* mutánsban már nem volt látható, tehát ez egy *e2fa-2* specifikus csonka E2FA fehérje. Eredményeink alapján az *e2fa* és *e2fb* T-DNS inszerciós mutánsok csonka fehérjéket termelnek, amelyek feltehetően nem tudnak kötödni az RBR fehérjéhez és transzaktivációs funkciójukat sem tudják ellátni. DNS-kötő képességükben ugyanakkor ezek az *e2f* mutánsok különbözhetnek egymástól. Az MB domén az *e2fa-2* esetében sértetlen, ezért itt a csonka fehérje feltehetően erősebben tud kötödni a DNS-hez. Ezzel szemben az *e2fa-1* és az *e2fb-1* esetében csak gyenge DNS kötés jöhet létre, mivel a T-DNS inszerció elrontotta az MB domént, de a DD domén még sértetlen. Az *e2fb-2* mutánsnál a T-DNS inszerció a DD-ba esik, amely megakadályozhatja a csonka fehérje DNS kötődését. Az általunk vizsgált tartalék fehérjék (SSP) a vad típus esetében kizárólag az érési beöfejlődési állapotban (S3) halmozódnak fel. Ezzel ellentétben az SSP fehérjék az *e2fb-2* mutáns kivételével az összes

*e2f* mutánsban korábban jelennek meg. Az eredményeink arra engednek következtetni, hogy a korai SSP indukció mértéke a különböző *e2f* mutánsok DNS-kötő képességétől függhet: legjobban az *e2fa-2* illetve az *e2fa-2/e2fb-1* mutánsokban látható, az *e2fa-1* és *e2fb-1* esetében kisebb mértékű volt a korai felhalmozódás, míg az *e2fb-2* esetében nem történt változás a vad típusú kontrollhoz képest. Az összes általunk vizsgált *e2f* mutáns a T-DNS inszerciónak köszönhetően elveszítette a C-terminális RBR kötő régióját, de minél jobban megőrizte az E2F mutáns fehérje a DNS-kötő képességét (a DD és az MB régiók jelenlététől függően), annál jobban gátolhatta az RBR represszor funkcióját, aminek köszönhetően a célgének de-represszáldóhattak.



## 21. ábra: Az *e2f* mutánsokban csonka, funkcióvesztéses mutáns E2F fehérjék szintetizálódhatnak.

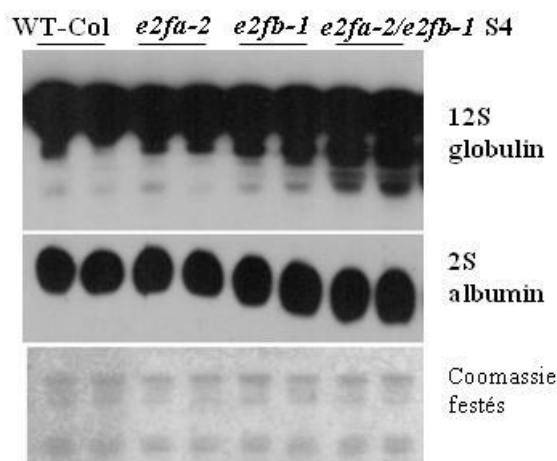
**A-B,** Fiatal *e2f* mutáns (*e2fa-1*, *e2fa-2*, *e2fb-1*, *e2fb-2* és *e2fa-2/e2fb-1*) és vad típusú csíranövények Western blot analízise (egy hetes csíranövények), melyhez a C-terminális specifikus anti-E2FB és N-terminális specifikus anti-E2FA ellenanyagokat használtuk (Magyar és mtsai., 2005 és részletesebben az Anyag és Módszerek részben). A nyílak a teljes méretű E2FA és E2FB fehérjéket jelölik, míg a nyílhegy egy kisebb méretű csonka E2FA fehérjére (45-50 kDa) mutat. A csillag az ellenanyaggal keresztreagáló aspecifikus fehérjét jelöl.

**C,** Anti-E2FB N-terminális ellenanyaggal történő Western blot eredménye. A fehérje extraktumokban az ellenanyaggal detektálható E2FB fehérjék láthatóak a bal oldali részben (beviteli ún. Input minta), míg a jobb oldali képen az anti-DPA ellenanyaggal történő Co-IP-t követő E2FB immunoblot eredménye látható. Nyíl mutatja az E2FB-GFP fehérjét, míg a nyitott nyíl az endogén E2FB fehérjét jelzi.

**D,** Az N-terminális specifikus anti-E2FB ellenanyaggal egy kisebb méretű E2FB fehérjét (35 kDa) azonosítottunk az *e2fa-2/e2fb-1* dupla mutánsban anti-DPA-val való ko-immunoprecipitálást követően (jobb oldali kép). A csonka fehérjét nyílhegygel jelöltük. Pozitív kontrollként anti-DPA-val ko-immunoprecipitált E2FA-GFP és E2FB-GFP fehérjéket használtunk (bal oldali kép). A nyíl a GFP jelölt E2FA és E2FB fehérjéket jelöli, a nyitott nyíl az endogén E2FB fehérjére, míg a nyílhegy a potenciálisan csonka E2FB fehérjére mutat (Dr. Molnár Eszter és Dr. Magyar Zoltán munkája alapján).

Mivel az *e2f* mutánsok magjában a két fő tartalék fehérje korábban halmozódik fel a magfejlődés során, kíváncsiak voltunk vajon mennyiségük megváltozik-e a magfejlődés végére, a vad típusú magokkal összehasonlítva. Eredményeink alapján a szimpla *e2fa-2* és *e2fb-1* mutánsok a vad típussal megegyező mennyiségű 2S albumint és 12S globulint halmoztak fel, míg az *e2fa-2/e2fb-1* mutáns a vad típusnál nagyobb mennyiségű 12S globulint halmozott fel

(22. ábra). Eredményeink alapján az *e2fa-2/e2fb-1* dupla mutáns embrió valószínűleg azért képes nagyobbra nőni, mint a vad típusú, mert nagyobb mennyiségű tartalék fehérjét (12S globulin) halmoz fel (10. táblázat) az embrióban.



**22. ábra:** A 12S globulin és 2S albumin fehérjék mennyisége szimpla és dupla *e2f* mutáns vonalak érett magjaiban (S4 becő stádiumban) a vad típusú kontroll magokhoz képest.

Specifikus anti-12S globulin és anti-2S albumin antitestet használtunk a Western blot során. Az érett magokból származó fehérjéket Coomassie blue festésével tettük láthatóvá (Dr. Magyar Zoltán munkája alapján).

Genotípus	Fehérje mennyiség/mag ( $\mu\text{g}$ )*	Arány §
Vad típus	$3,1 \pm 0,1$	-
<i>e2fa-2</i>	$3,7 \pm 0,1$	1,2
<i>e2fb-1</i>	$3,3 \pm 0,2$	1,08
<i>e2fa-2/e2fb-1</i>	$5,2 \pm 0,3$ ***	1,66

**10. táblázat:** Az *e2fa-2/e2fb-1* dupla mutáns magok nagyobb mennyiségű fehérjével rendelkeznek, mint a vad típusú magok.

\*A szórást  $\pm$  jelöltük. § A vad típusú és az *e2f* mutáns értékek aránya. \*\*\* $P \leq 0,001$  szignifikáns különbségnek az *e2fa-2/e2fb-1* mutáns és a vad típus között fogadtuk el.

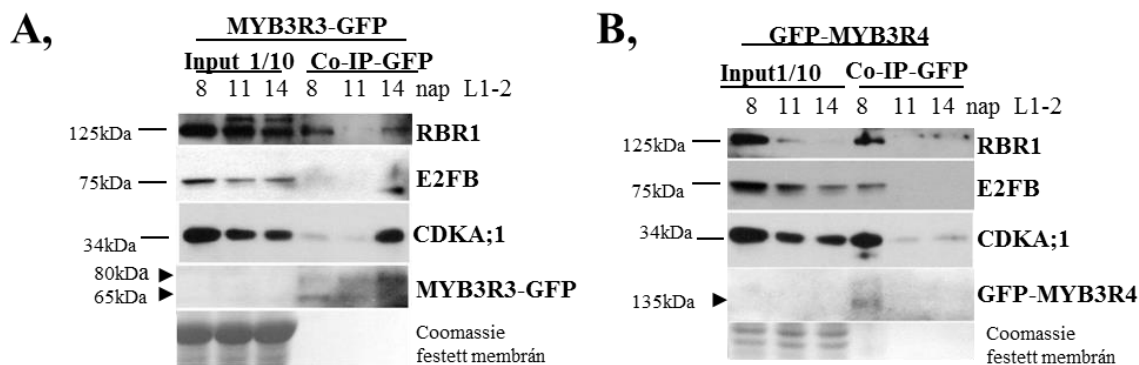
## 10. Növényi DREAM-fehérje komplexek kimutatása Arabidopsisban és repcében

Az E2FA és E2FB transzkripciós faktorok funkcionális jellemzése során megállapíthattuk, hogy az osztódási gének aktiválásában betöltött szerepük nem esszenciális komponense a növényi sejtosztódás szabályozásának. Kimutattuk ugyanakkor, hogy elsősorban, mint represszorok, fontos koordinációs szerepet játszanak az osztódási és differenciálódási

folyamatok összehangolásában. Ezt láthattuk a levelek fejlődése (Őszi és mtsai., 2020), és az embriógenézis során egyaránt (Leviczky és mtsai., 2019). Nem pontosan ismert azonban, hogyan, és milyen fehérjékkel együttműködve represszálhatnak ezek a transzkripcionális szabályozók. Nemrégiben az állati E2F fehérjét több komponensű fehérje komplexekben mutatták ki, ahol a komplexek összetétele a különböző állati modellekben egymáshoz nagyon hasonló volt (Drosophila-légy, Caenorhabditis-fonálféreg, egér és emberi sejt kultúra modellekben). Az egyik legelső komplexet a Drosophila embrióból tisztították és a benne résztvevő komponensek után dREAM-nek nevezték el (drosophila RBF-E2F-And-MIP), de hasonló összetételű fehérje komplex a fonálféregből tisztított DRM (DP, Rb, MuvB), vagy az emlősökből izolált DREAM (DP, Rb, E2F and MuvB és a későbbiek során csak DREAM). Az állati DREAM komplexek funkcionális jellemzése során megállapították, hogy elsődleges funkciójuk a represszió: differenciálódási géneket kapcsolnak ki osztódó sejtekben, és megakadályozzák, hogy a korai illetve késői sejtciklus gének rosszkor, pontatlanul működjenek a sejtciklus során (Sadasivam és deCaprio, 2013).

A légy DREAM komplexben a MYB transzkripciós faktorról közös komplexet alkot az E2F és az RBF (a légy retinoblastoma faktora) fehérje. Az Arabidopsis több száz MYB rokon fehérjével rendelkezik, és ezek között található öt olyan ún. MYB3R fehérje (MYB3R1-5), amelyek strukturálisan és funkcionálisan is közel állnak az állati MYB transzkripciós faktorokhoz (Kobayashi és mtsai., 2015). A MYB3R fehérjét szerepükénél fogva két alcsoportba lehet sorolni, úgy, mint represszor MYB3R (Rep-MYB; MYB3R3,5) valamint az aktivátor MYB3R (Act-MYB; MYB3R1,4), de a későbbi eredmények alapján a MYB3R1 sejtciklus fázistól függő módon akár represszor és aktivátor is lehet (Kobayashi és mtsai., 2015). Egy kooperációs munka keretében megnéztük, hogy az aktivátor MYB3R4 és a represszor MYB3R3 képes-e komplexbe lépni az RBR és E2F fehérjékkel. Ehhez olyan transzgenikus Arabidopsis vonalakat használtunk fel, ahol a két MYB3R gént fuzionálták a GFP (zöld fluoreszcens fehérje) fehérjével, és a saját szabályozó-promóter régiójuk irányítása alá vonták őket (Kobayashi és mtsai., 2015). A GFP-specifikus ellenanyag felhasználásával immunoprecipitálási eljárással fehérje komplexeket tisztítottunk a MYB3R4-GFP és a MYB3R3-GFP termelő növények leveléből (első levél pár) különböző fejlődési időpontokban. Az RBR fehérjét mindkét tisztított fehérje komplexben ki tudtuk mutatni, de az E2FB a fiatal osztódó levélben egyedül az aktivátor MYB3R4 fehérjéhez kapcsolódott (23. ábra).





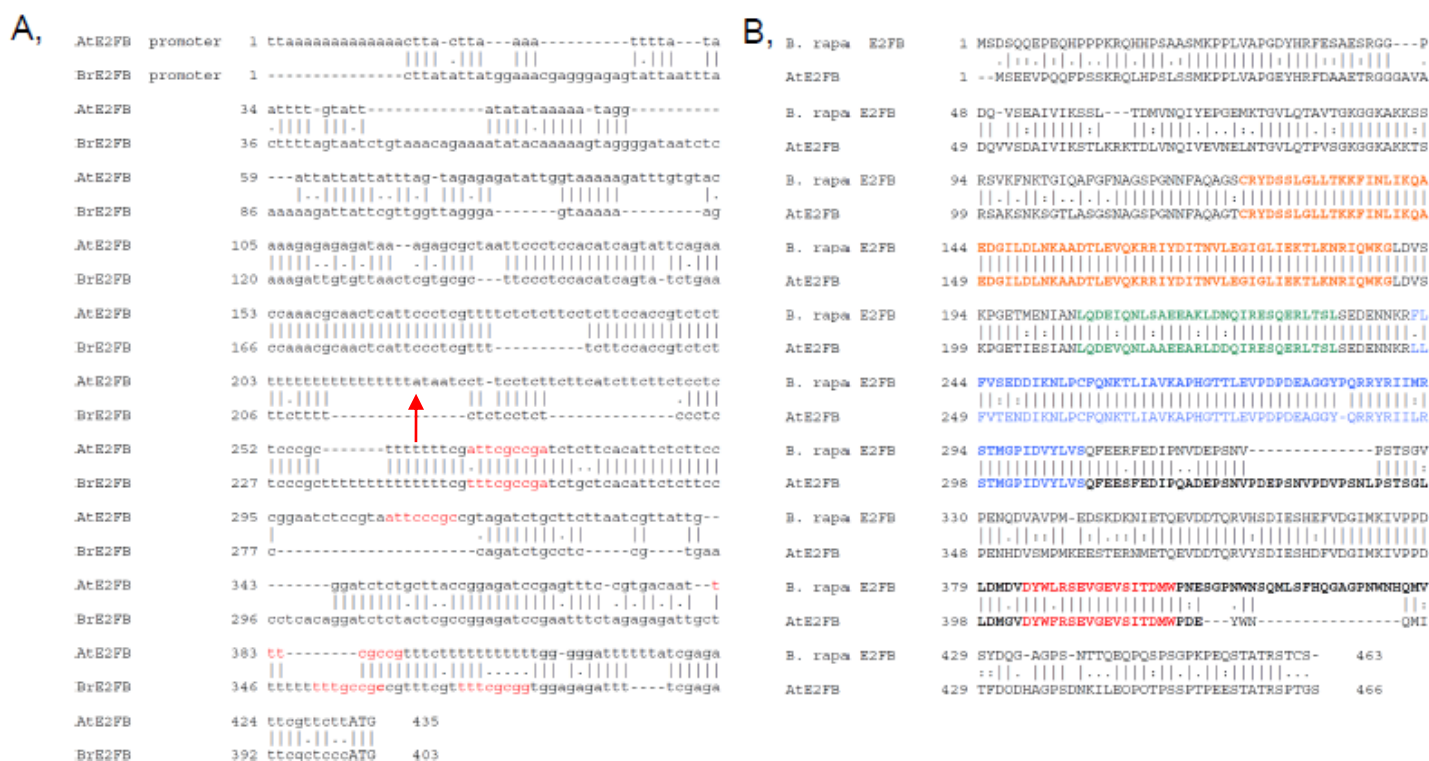
**23. ábra. Az RBR komplexbe lép mindkét MYB3R fehérjével, de az aktivátor E2FB specifikusan csak az aktivátor MYB3R4 fehérjével asszociálódik.**

**A-B,** Az immunoprecipitaláshoz az első levélpárt használtuk fel a MYB3R3-GFP (**A**) és a GFP-MYB3R4 (**B**) termelő transzgenikus növényekről. A jelzett időpontokban gyűjtöttük be a leveleket (8-11-14 nappal a csírázást követően). GFP immunoprecipitalás után az ábrán jelzett specifikus ellenanyagokkal vizsgáltuk meg a komplexek összetételét (jobb oldalon). Az immunoblottok bal oldalán látható az Inputban az immunoblotban vizsgált fehérjék előfordulási mennyisége (a co-IP-ben felhasznált fehérje mennyiségének 1/10-ét vittük fel az inputhoz). A molekulásúly markerek a baloldalon vannak jelezve. A nyílhegyek a specifikus MYB3R fehérjét jelölik. A membránon található fehérjék egyenlő mennyiségét Coomassie festéssel ellenőriztük.

Egy másik kísérletben a MYB3R3 fehérje specifikusan kölcsönhatott a represszor E2FC-vel, de már csak a differenciálódó levelekben (Kobayashi és mtsai., 2015). Ez alapján az E2FB és az E2FC a levél eltérő fejlődési pontjaiban különböző MYB3R transzkripciós faktorokkal lép komplexbe. Az aktivátor MYB3R4, amely specifikusan csak a sejtosztódás G2-M fázisában expresszál, az aktivátor E2FB-vel asszociálódik, amely maga is kifejeződik a sejtciklus G2-M fázisában (Magyar és mtsai., 2005). A represszor MYB3R3 ugyanakkor a represszor E2FC-vel lép komplexbe, mégpedig abban a levélfejlődési stádiumban, amikor már a differenciálódás domináns a sejtosztódás felett. Ez alapján feltételezzük, hogy ez a komplex gátolhatja a sejtosztódási géneket a már differenciálódó levélsejtekben. Ezt támasztja alá az is, hogy az E2FC géncsendesített növényben a sejtosztódási gének aktivitását lehetett megfigyelni már differenciált levelekben (del Pozo és mtsai., 2006). A DREAM komplexek további alkotó elemei az ún MYB-Interacting Proteinek (MIP). Az általunk létrehozott pgE2F-GFP expresszáló transzgenikus Arabidopsis vonalainkat használtuk fel arra a célra, hogy tovább vizsgáljuk az E2F komplexek összetételét. A GFP-fúziós E2F fehérjét immunoprecipitalási eljárással tisztítottuk egy hetes csíranövényekből és a kölcsönható partnereiket tömegspektrometriás módszerrel határoztuk meg (Kobayashi és mtsai., 2015). Az E2FB és E2FC kölcsönható partnerei között megtaláltuk a MIP fehérjék néhány növényi megfelelőjét: az ALWAYS EARLY 2 és 3-t

(röviden ALY2,3), amely a MIP130/LIN9 névre hallgat az állatokban, a TESMIN/TSO1-CXC DOMÉNT tartalmazó TCX5-öt, amelynek az állati megfelelője a MIP120/LIN54, és a MULTICOPY SUPPRESSOR OF IRA1-et (röviden MSI1), amely az állatokban az CAF1/RBBP4 (Kobayashi és mtsai., 2015; Magyar és mtsai., 2016; valamint nem közölt eredményeink alapján). Az E2FB és az E2FC fehérjével ellentétben az E2FA fehérjével kölcsönható DREAM komponenseket nem találtunk (Horváth és mtsai., 2017 és Pettkó-Szandtner nem közölt eredményei alapján). Ezek alapján megállapíthatjuk, hogy a növényekben is megtalálhatóak a DREAM komplexek, amelyek a hasonló állati fehérjekomplexekhez hasonlóan fontos szerepet játszhatnak növényekben is a sejtosztódás szabályozásában, valamint a differenciálódás és az osztódás koordinálásában.

Az Arabidopsis közeli rokona a repce, amely fontos gazdasági növény. Ez lehetőséget nyújt arra, hogy az Arabidopsisban szerzett ismereteinket hasznosíthassuk a repcében. Azonosítottuk a repce (*Brassica napus*) E2FB megfelelőjét is. Az Arabidopsis és a repce E2FB fehérje szekvenciái a két növényfaj közti közeli rokonságra jellemzően nagyon hasonlóak és a funkcionális régiókban szinte teljesen megegyeznek egymással (24. ábra). A repce és az Arabidopsis E2FB promóter régiójában vannak nagyon homológ szakaszok, és mind a két növényfaj szabályozó szakaszában azonos számban fordulnak elő E2F-kötő szekvenciák, még ha nem is teljesen azonos pozícióban.



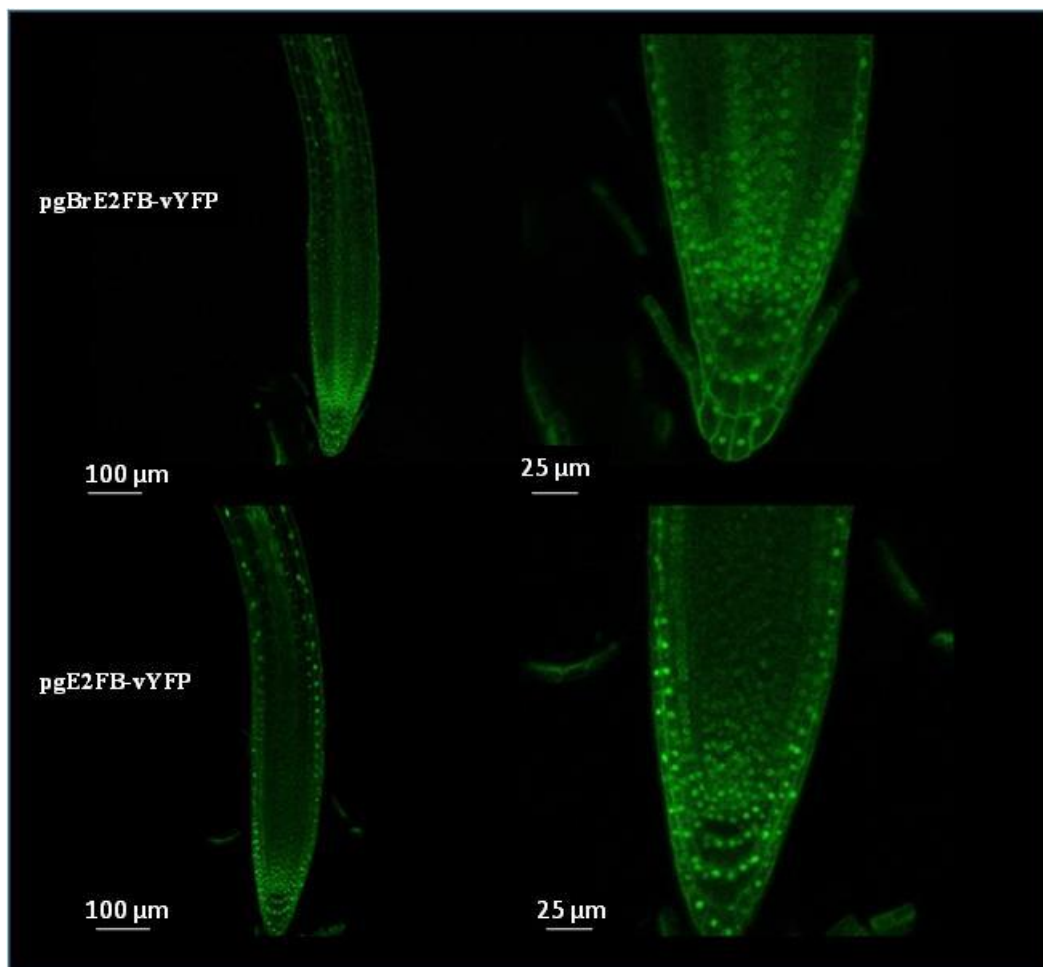
**24. ábra: *Brassica napus* és *Arabidopsis thaliana* E2FB szekvenciáinak összehasonlítása.**

**A,** *Brassica napus* és *Arabidopsis thaliana* translációs start kodon előtti (upstream) 400 bp-os promóter régiójának nukleotid szekvencia szintű összehasonlítása. Piros betűvel jelöltük az E2F kötőhelyeket. Piros nyílal jelöltük a transzkripció starthelyet (+1) az AtE2FB esetében.

**B,** *Brassica napus* és *Arabidopsis thaliana* E2FB fehérjék aminosav szintű összehasonlítása. A DNS-kötő régiót narancssárga, a dimerizációs domént zöld, a Marked box-ot kék, az RB-kötő domént piros színnel jelöltük.

A repce (*Brassica napus* cv. Westar) E2FB genomi változatával is készítettünk egy vYFP fúziós konstrukciót, amelyet a repce E2FB saját promótere hajt meg (pgBrE2FB-vYFP). Transzgenikus *Arabidopsis* növényeket hoztunk létre ezzel a konstrukcióval. Megvizsgáltuk, illetve összehasonlítottuk a repce és az *Arabidopsis* E2FB fehérje mintázatát *Arabidopsis* gyökerében konfokális lézer scanning mikroszkóp segítségével. Ehhez a munkacsoport által készített fluoreszcens fehérjével jelölt E2FB-t expresszáló a saját promótere által meghajtott konstrukciót tartalmazó *Arabidopsis* vonalat (pgE2FB-vYFP; Őszi és mtsai., 2020) használtuk fel. Az *Arabidopsis* és a repce E2FB fehérjék nagyon hasonló expressziós mintázattal rendelkeznek a transzgenikus *Arabidopsis* növények gyökér merisztémájában. Mindkét esetben az E2FB dominánsan sejtmagi lokalizációjú a gyökérsejtekben. Meglepő módon mindkét növényi E2FB fehérje erősebb fluoreszcens jelet mutatott azokban a gyökér sejtekben, amelyek már kiléptek a sejtosztódásból, mint a gyökérsüvegben található ún., columella sejtek, az oldalsó gyökérsüveg sejtek, valamint a megnyúlási gyökérszónában a bőrszöveti és kérgi sejtek (25.

ábra). Mindez arra enged következtetni, hogy az E2FB fontos szerepet játszhat a sejtmegegyülésben és differenciálódásban is.



**25. ábra: Brassica (pgBrE2FB-vYFP) és Arabidopsis (pgE2FB-vYFP) E2FB fehérjék expressziós mintázata fiatal Arabidopsis csíranövények gyökerében.**

Konfokális lézer mikroszkópiás felvételek. Az E2FB-vYFP jel zöld színnel látható. Az ábrák tartalmazzák a méretskálát.

A pgBrE2FB-vYFP-t tartalmazó Arabidopsis transzformáns vonal segítségével az anti-GFP immunoprecipitálást követően tömegspektrometriás eljárással meghatároztuk a repce E2FB transzkripció faktorral kölcsönható fehérje partnereket. Az Arabidopsis és a repce E2FB nagyon hasonló fehérje komponensekkel lép komplexbe. Mindkét E2FB fehérje esetében (pgBrE2FB-vYFP-t vagy pgE2FB-vYFP-t tartalmazó Arabidopsis növények) a legerősebb kölcsönható partnerek a már jól ismert fehérjék voltak (RBR, DPA és DPB), de a repce E2FB is kölcsönhatott a növényi DREAM komplex egyik komponensével, az ALY3 fehérjével. Az Arabidopsis E2FB-vYFP ugyanakkor új, eddig nem azonosított DREAM fehérjékkel is asszociálódott (TCX6, MYB3R1; 11. táblázat). A repce E2FB az Arabidopsis E2FB-hez képest

csak gyengén vett részt DREAM komplexekben. Feltételezhetően azért, mert a repce és az Arabidopsis E2FB közti különbségeknek köszönhetően a repce E2FB-vYFP kevésbé tud versenyezni az endogén E2FB-vel, mint az Arabidopsis E2FB-vYFP. További kísérletekre van szükség ahhoz, hogy ezt a kérdést jobban meg tudjuk válaszolni.

Azonosított DREAM komponensek	Azonosított peptidek száma	
	BrE2FB	AtE2FB
RBR	33	59
E2FB	37	47
DPA	10	10
DPB	21	29
ALY3	3	5
MSI1	-	4
TCX5	-	4
ALY2	-	2
TCX6	-	1
MYB3R1	-	1

**11. táblázat: Brassica és az Arabidopsis E2FB fehérjék kölcsönható partnerei.**

Brassica és Arabidopsis E2FB transzkripciós faktorok kölcsönható partnereinek azonosítása tömegspektrometriás eljárás segítségével.

# DISZKUSSZIÓ

## 1. Az aktivátor típusú E2F transzkripciós faktorok szerepe a fejlődő embrióban

Munkánk során megvizsgáltuk, hogy a magfejlődés során az E2FA és E2FB transzkripciós faktorok szükségesek-e a sejtciklus szabályozásában részt vevő gének kifejeződéséhez illetve, hogy milyen hatással van az embrionális sejtszámra az aktivátor E2F transzkripciós faktorok hiánya. Kíváncsiak voltunk, vajon a sejtosztódási gének mellett az E2F faktorok más szabályozó gének (munkánk során a *LEC1* gént, a magérési gének AFL családját és a *WR11* gént vizsgáltuk meg) működését is képesek-e befolyásolni a fejlődő magban és becőben, és ha igen akkor ez milyen hatással van a fejlődő embrióra és magra, valamint megvizsgáltuk, hogy ezek az aktivátor E2F transzkripciós faktorok közvetlenül tudják-e szabályozni magát a magérési programot.

### 1.1. Az E2FA és az E2FB mutációja nincs hatással a fejlődő embrió sejtszámára

Eredményeink alapján az S-fázis specifikus szabályozó gének expressziója nem változott meg sem az *e2fa-2*, sem pedig az *e2fb-1* mutánsokban, míg az *e2fa-2/e2fb-1* dupla mutánsban némileg csökkent a kifejeződési szintjük, amely azt jelenti, hogy a két aktivátor E2F párhuzamosan (redundáns módon) hat az S fázis specifikus szabályozó génekre. Ezzel ellentétben, a mitotikus *CDKB1;1* expresszióját a két aktivátor E2F inkább ellentétesen szabályozza: az E2FB aktiválja, míg az E2FA gátolja (12. ábra). Korábbi eredmények alapján ismert, hogy a két aktivátor E2F közül csak az E2FB fejeződik ki a sejtciklus G2-M fázisa során (Mariconti és mtsai., 2002; Magyar és mtsai., 2005). Az E2FA mérsékelt túltermeltetése csak az S fázis specifikus gének kifejeződését fokozza, míg a *CYCD3;1* konstitutívan magas expressziója az E2FB-hez hasonlóan hiperaktiválja, mind az S mind pedig az M fázisú sejtciklus szabályozó géneket (de Jager és mtsai., 2009). A *CYCD3;1* túltermelő vonalban az E2FB felszabadul az RBR gátlás alól, míg az E2FA-RBR komplex továbbra is kimutatható marad, ami a két aktivátor E2F eltérő szabályozására enged következtetni (Magyar és mtsai., 2012). Eredményeink alapján a két aktivátor E2F funkciójára szükség van a sejtciklus szabályozó gének

teljes, maximális kifejeződéséhez, ugyanakkor az *e2fa-2/e2fb-1* dupla mutáns embriók hasonló számú sejttel rendelkeznek, mint a vad típusú embriók (13. ábra). Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy az embrionális sejtosztódás során az E2FA és E2FB TF-ok szerepet játszanak ugyan a sejtciklus célgének kifejeződésében, de nem esszenciálisak ezeknek a géneknek a bekapcsolásához. A sejtciklus szabályozó gének csökkent expressziója ugyanakkor nem vezet kevesebb sejt kialakulásához, ami kompenzációs szabályozási folyamatok jelenlétére utalhat (pl. fehérje szinten). Az aktivátor E2F TF-ok szabályozó szerepét már a posztembrionális fejlődés során, a merisztematikus sejtosztódásokban sem találták nélkülözhetetlennek (Wang és mtsai., 2014). Ezek a növényi eredmények összhangban vannak az állati modell rendszerek tanulmányozásából származó korábbi eredményekkel, amely alapján egy olyan általános modell van kialakulóban, mely szerint a sejtciklus gének bekapcsolásához az aktivátor E2F funkció a normál sejtosztódáshoz nem szükséges sem az embrionális, sem pedig a posztembrionális fejlődés alatt (Chen és mtsai., 2009; Magyar és mtsai., 2016; Zippa és Frolov, 2016).

Kimutattuk, hogy a markánsan nagyobb magokon és embriókon kívül az *e2fa-2/e2fb-1* dupla mutánsok magjában és az embriókban nem található más fejlődési rendellenesség. Érdekes módon azonban az *e2fa-2/e2fb-1* dupla mutáns növények becőtermése rövidebb és kevesebb magot tartalmaz, mint a vad típusú becők (9. táblázat, 13. ábra). Eredményeink alapján az *e2fa-2/e2fb-1* dupla mutáns csökkent termékenységgel rendelkezik. Korábbi adatok alapján a termékenységi problémák az átlagos magtömeg 33 %-os megemelkedését okozhatja (Ohto és mtsai., 2005). Ez az érték megegyezik azzal, amit az *e2fa-2/e2fb-1* dupla mutáns esetében tapasztaltunk. Az *e2fa-2/e2fb-1* dupla mutáns esetében nem detektáltunk sejtosztódási hibákat és a mutáns növények a posztembrionális fejlődés során sem különböztek a vad típustól. Nemrég közölt eredmények alapján a három *Arabidopsis* E2F többféle módon szabályozza a csíravonal fejlődést és befolyásolja a termékenységet a pollenfejlődésen és a megaspróra anyasejten keresztül (Yao és mtsai., 2018). A dupla *e2fa-2/e2fb-1* mutáns pollen fejlődésében mi is megfigyeltünk rendellenességeket a kontrollhoz képest, ami arra enged következtetni, hogy az E2FA és E2FB fontos, meghatározó szerepet játszik az ivarsejtképződésben (14. ábra). Érdekes módon, az E2FA és E2FB mutánsok egy másik allél kombinációja már nem életképes (*e2fa-1/e2fb-1* vagy *e2fa-1/e2fb-2* dupla mutáns nem jön létre). Az *e2fa-1* az *e2fa-2* mutánshoz képest elveszítette a MB doménjét, ami az MB régió élettani szerepét hangsúlyozza. Az *e2fa-1* és az *e2fb* mutánsokat (*e2fb-1* és 2) ugyanakkor kombinálhattuk az *e2fc* mutánsokkal (*e2fc-1* és *e2fc-2*), és ezek a dupla homozigóta mutánsok termékeny utódokat hoztak létre, ami tovább erősíti azt a nézetet, hogy az aktivátor E2F-ek rendelkeznek „valamilyen”, az MB doménhez köthető esszenciális funkcióval, és ez a funkció feltehetően az ivarsejtképződése során játszik fontos

szerepet. Pontosan mi lehet ez a szabályozó szerep még nem ismert. Az *e2fab*c tripla mutánsnak kevés, még az *e2fa-2/e2fb-1* dupla mutánsnál is kevesebb magja van, viszont a növény termetét a mutáció láthatólag nem befolyásolja (Wang és mtsai., 2014; Yao és mtsai., 2018). Összességében megállapíthatjuk, hogy a növényi E2F-ek egyike sem esszenciális a sejtosztódás elindításához, legalábbis a sporofita fejlődés során (26. ábra). Vannak arra utaló jelek, hogy néhány távoli rokonságot mutató E2F, mint például az E2FD (DEL2) pozitív szereppel rendelkezik a sejtosztódás során (Sozzani és mtsai., 2010), és mindhárom E2F hiányában részt vehetnek a sejtciklus gének pozitív szabályozásában, de további vizsgálatok szükségesek ennek az elméletnek az igazolására.

## **1.2. A mag érése során az E2FA és az E2FB represszorként funkcionál az osztódási fázison keresztülment embrionális sejtekben**

Az embriófejlődés során a sejtosztódás és az érés közötti átmeneti fázis alatt a sejtciklus gének kikapcsolt állapotba kerülnek, ám ennek a molekuláris mechanizmusa még nem tisztázott. Eredményeink alapján az *e2fa-2/e2fb-1* dupla mutánsban a sejtciklus gének expressziója a sejtosztódási fázis befejeződése után nem tűnik el teljesen (12. ábra). Ez alapján a két aktivátor típusú E2F transzkripciós faktor represszorként hat a sejtciklus szabályozó géneken, amikor a magfejlődés az érési fázis felé halad. Valószínűleg az E2F transzkripciós faktorok a magfejlődésnek ezen a pontján represszor komplexbe lépnek az RBR fehérjével. Valóban az E2FA és E2FB fehérjék csak úgy, mint az őket szabályozó RBR fehérje jelen vannak a poszt-mitotikus embrionális sejtekben (9. ábra). Az *rbr* mutáns embriókban a sejtszám az érési fázis során növekszik meg (Gutzat és mtsai., 2011). Az *e2fa-2/e2fb-1* dupla mutáns embrió esetében ugyanakkor nem láttunk változást a sejtszámban, feltételezhető, hogy az RBR az E2FC fehérjével komplexben továbbra is képes szabályozni a sejtosztódást az embriógenézis érési szakaszában.

Mindezek alapján az RBR központi szerepet játszik a végső sejtszám kialakításában az embrió és a poszt-embrionális növényi szervek vonatkozásában egyaránt. Feltételezzük, hogy ebben a szabályozásban az RBR szorosan együttműködik, represszor komplexeket létrehozva az E2F-ekkel. Érdekes módon, a csökkent RBR funkció (pl. redukált expresszió, gyengült aktivitás révén) a növényekben az állatokhoz nagyon hasonlóan számfeletti osztódáshoz és tumoros növekedéshez vezet (Borghi és mtsai., 2010; Gutzat és mtsai., 2011; Chen és mtsai., 2009). Állati modell rendszerek esetében, mint amilyen például az egér is az aktivátor E2F1-3



transzkripció faktorok inaktiválásával az *rb* mutáns állatokban meg lehetett akadályozni a tumor kialakulását, jelezve, hogy az állati E2F funkció esszenciális a tumorfejlődéshez, de nélkülözhető a normális sejtsztódások során (Chen és mtsai., 2009). Növényekben még kimutatásra vár, hogy az E2F transzkripció faktorok eltávolítása az *rbr* mutáns vonalban vissza tudja-e állítani a normális sejtsztódást és fejlődést. Mivel az RBR fehérje a CDKA;1 elsődleges szubsztátja (Nowack és mtsai., 2012), szintén érdekes kérdés lehet, hogy az E2F transzkripció faktorok hiánya a *cdka;1* mutánsban vajon helyreállítja-e a normális embrió fenotípust (elsősorban a csökkent sejtszámot).

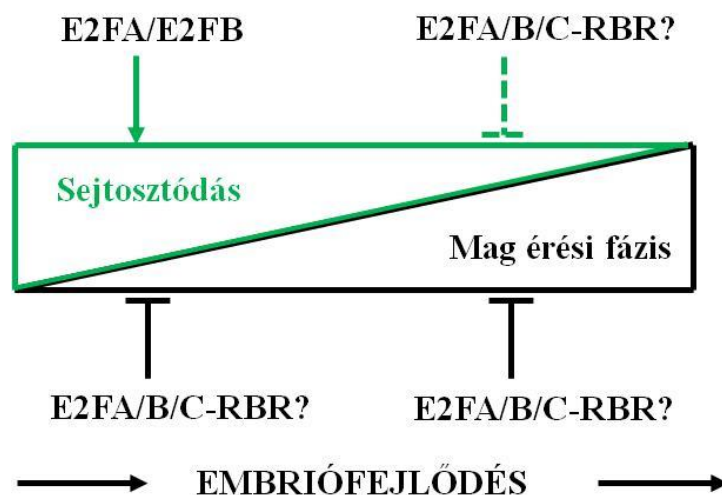
### **1.3. Az aktivátor típusú E2F transzkripció faktorok a mag fejlődési fázisától függően represszorként működnek az érési géneken**

Korábbi eredmények alapján a *LEC* gének (*LEC1-2*) funkcióvesztéses mutációja csökkenti a tartaléktápanyagok felhalmozódását (Braybrook és Harada, 2008). Eredményeink alapján mindkét *LEC* gén (*LEC1-2*) idő előtt bekapcsolódik az *e2fa-2/e2fb-1* dupla mutánsban (15. B ábra). Kimutattuk azt is, hogy a *LEC2* gént az E2FA TF közvetlenül is szabályozhatja az érési fázis során, mégpedig a promóterében található E2F kötőhelyen keresztül (16. B ábra). A *LEC2* expressziója az *e2fb-1* mutánsban ugyanakkor már az érési fázist megelőzően aktiválódott, jelezve, hogy az E2FB transzkripció faktor korábban szabályozza a *LEC2*-t, mint az E2FA (15. B ábra). Amikor a *LEC2* promóterében az E2F kötőhelyet rontottuk el, a *LEC2* expressziója már a legelső becőmintában (S1), a morfogenezis során aktiválódott, ami tovább erősíti azt a képet, hogy az E2F transzkripció faktorok együttesen megakadályozzák a *LEC2* idő előtti működését. Egy másik potenciális E2F célgén, a *WR11* a *LEC2* génhez hasonlóan idő előtt aktiválódott, amikor elrontottuk a promóterében található E2F-kötő szekvenciát (16. C,D,E). Mindezek alapján, az E2F-ek a magérési gének negatív szabályozói, de nem csak a fejlődési fázisra specifikusan korlátozzák azok működését (azaz nem engedik bekapcsolódni őket az osztódó embrióban), hanem a mag érési fázisa során is képesek befolyásolni az expressziós szintjüket (mintegy beállítják, finoman hangolják az expressziójukat – 26. ábra). Az Arabidopsis *rbr* co-suppression mutáns vonal (csRBR, ahol túltermeltetett RBR valamilyen ismeretlen mechanizmuson keresztül gátolta a saját és az endogén RBR kifejeződését) fiatal csíranövényeiben az embrionális érési gének, többek között a *LEC2* és az *ABI3* továbbra is aktívak maradnak, jelezve, hogy az RBR szabályozza ezeket a géneket a poszt-embrionális fejlődés során (Gutzat és mtsai., 2011). A poszt-embrionális növényekben ezek a gének a

Polycomb Group (PcG) szabályozása alatt állnak (Yang és mtsai., 2013). Ezek az evolúciósan konzerválódott több komponensű fehérje komplexek növényekben is megtalálhatóak. Vajon az E2F-ek és az RBR közvetlenül részt vesznek a PcG működésében, vagy közvetve szabályozzák a PcG funkcióját, esetleg egy párhuzamosan működő szabályozásról van szó? Ezekre a kérdésekre a válasz egyelőre nem ismert. Az eredményeink azonban tovább erősítik azt a nézetet, hogy az E2F-ek fontos szerepet játszanak a fejlődési átmenetekben.

Eredményeink alapján a mag fő tartalék fehérjéi, a 12S globulin és a 2S albumin idő előtt, már a magfejlődés morfogénikus fázisában (S1) felhalmozódnak, bár az *e2fa-2*, az *e2fb-1* és az *e2fa-2/e2fb-1* dupla mutáns vonalakban különböző mértékben. Legerősebben az *e2fa-2* és az *e2fa-2/e2fb-1* dupla mutánsokban, és gyengébben az *e2fb-1* mutánsban (19. ábra). Érdekes módon, ebben a korai időpontban a mag érését szabályozó AFL gének egyike sem aktiválódott az *e2fa* és *e2fb* mutánsokban, jelezve, hogy az *e2f* mutánsokban nem az AFL géneknek tulajdonítható a tartalék fehérjék idő előtti felhalmozása (15. A). Korábbi eredményeink alapján az E2FA az RBR-rel represszor komplexbe lépve megakadályozza a levélfejlődés során a mitózis és az endociklus (a differenciálódó sejtekre jellemző módosult sejtciklus, ahol csak az S-fázis ismétlődik) közötti átmenetet (Magyar és mtsai., 2012). Ez arra enged következtetni, hogy az E2FA az RBR-rel komplexben fejlődési átmeneteket szabályoz. Amikor az E2FA és a DPA dimerizációs partner egyidejűleg lett túltermeltetve, a differenciálódás gátolódását lehetett a korai csíranövény fejlődése során megfigyelni (DeVeylder és mtsai., 2002; Kosugi és Ohashi, 2003). Hasonló kísérletben, egy olyan E2FA mutánst termeltettek túl a DPA-val, amelyik sem transzaktiválásra sem RBR kötésre nem volt képes. Ebben a mutáns növényben az endociklus jóval korábban kapcsolódott be a kontroll növényekhez képest, és a sejtek DNS tartalma (ploidy szint) lényegesen megnőtt (Magyar és mtsai., 2012). Meglepő módon a transzaktivációs képesség hiányában is a sejtciklus szabályozási gének korai működését lehetett megfigyelni (pl. *Ccs52A1-2*), ami arra engedett következtetni, hogy ezek a gének a levél fejlődése során a gátolódás alól szabadultak fel (ún. de-represszió - Magyar és mtsai., 2012). Az E2FA tehát potenciálisan represszorként funkcionálhat a magérési program átmeneti szakaszának szabályozásában is, jelezve, hogy az E2FA gátló szerepe nemcsak a kicsírázott növényekre korlátozódik. Azt, hogy az E2FA ezt a gátló szerepét vajon az embrióban is az RBR-rel komplexben végzi-e el még nem tudjuk. Ugyanakkor, mind az E2FA, mind az RBR fehérje a magfejlődés morfogénikus szakaszában halmozódik fel a legnagyobb mértékben, amely támogatja azt a hipotézist, miszerint a magfejlődés korai szakaszában gátló komplexet hozhatnak létre (10. ábra). Érdekes, hogy az SSP fehérjék felhalmozódása kisebb mértékű volt az *e2fa-1* és az *e2fb-1* mutánsokban az *e2fa-2* mutánssal összehasonlítva és egyáltalán nem volt

megfigyelhető az *e2fb-2* mutánsban (19. ábra). Az *e2fa-1* és az *e2fb-1* mutánsok esetében megközelítően hasonló csonka E2F fehérjék jöhetnek létre, amelyek még bizonyos funkciókat megőrizhettek (dimerizációs képesség, DNS-kötődés), míg másokat elveszíthettek (transzaktiválás, RBR-kötés). Feltételezzük, hogy a T-DNS inszerció különböző, funkcióvesztéses fehérje mutánsokat hozhatott létre ezekben a mutáns vonalakban: az az *e2f* mutáns, amelyik elveszítette a dimerizációs képességét (*e2fb-2*) nem volt képes stimulálni a tartalék fehérjék idő előtti felhalmozódását. Ezzel szemben, az az *e2f* mutáns (*e2fa-2*) indukálta legerősebben a tartalék fehérjék korai felhalmozódását, amelyik potenciálisan a legjobban képes dimerizálni a DP faktorokkal (DPA-B) és ennek következtében a legerősebben kötődhet a célgénekhez. Kísérletesen még igazolásra vár, hogy ezek a csonka proteinek valóban nem képesek kötni az RBR fehérjét és transzaktiválni sem tudnak, így a fő különbséget köztük a DNS kötő képességük jelenti. Lehetséges, hogy a csonka E2FA mutáns fehérjetermék elfoglalja a DNS kötő helyet és megakadályozza más gátló komplexek kialakulását (mint, amilyenek például bizonyos DEL fehérjék is).



**26. ábra: Az aktivátor E2F-ek feladatát a mag és az embriófejlődés során bemutató modell.**

A mag és embriófejlődést két egymást követő, ellentétesen szabályozott folyamat határozza meg. Az első az osztódási fázis, melynek során létrejönnek az embrióra jellemző szervek és szövetek (morfogenezis), a második a mag érési fázisa, amely során megtörténik a differenciálódás és fő eseménye a tartaléktápanyagok felhalmozódása (zöld és fekete háromszögek). Az aktivátor E2F-ek feladata a morfogenezis során a sejtciklus szabályozó gének teljes mértékű aktiválása, míg az érési fázisban a magnyugalmi állapot megteremtése a sejtosztódás gátlásán keresztül, feltehetően az E2FC-vel együtt és az RBR-el komplexet alkotva. Az aktivátor E2F-ek gátolják a morfogenezis során a mag érési programját. Megakadályozzák a mag érési gének, mint a *LEC2* és a mag tartalék fehérjéinek, mint a 2S albumin és a 12S globulin idő előtti felhalmozódását. A magfejlődés differenciálódási fázisa során pedig finoman hangolják a mag érési gének kifejeződését és ebben a szabályozási folyamatban feltehetően az E2FC és az RBR is részt vesz.

## **2. Az embrionális *LEC2* és *WRI1* gének gyökér kifejeződését ellentétesen szabályozzák az E2F-ek**

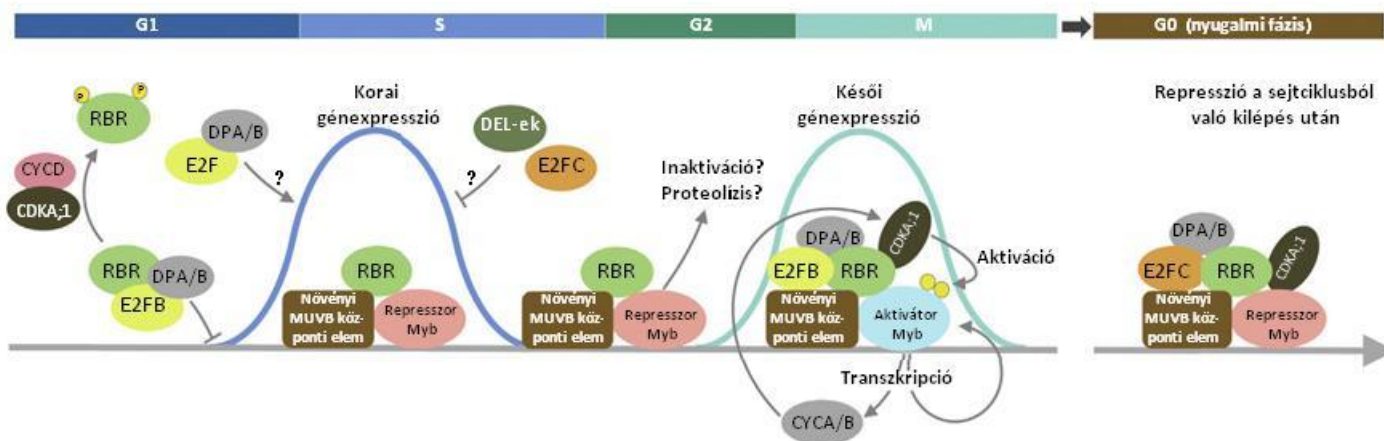
Az expressziós adatbázis szerint (eFP browser - Winter és mtsai., 2007) a *LEC2* kifejeződése kizárólagosan, míg a *WRI1* expressziója dominánsan az embriófejlődésre korlátozódik, de alacsonyabb szinten a gyökérben is detektálták. A legújabb eredmények alapján azonban a *LEC2* a gyökérfejlődésben is szerepet játszik (Tang és mtsai., 2017). Kíváncsiak voltunk, hogy a riporter vonalaink segítségével detektálni tudjuk-e a *LEC2*-t és a *WRI1*-et a gyökérben. Eredményeink alapján mind a *LEC2*, mind a *WRI1* promóter expresszáldik a gyökérben, valamint kimutattuk, hogy mindkét embrionális gén legerősebben az ún. gyökérössajt régióban fejeződik ki (18. ábra). Megállapítottuk, hogy az E2F transzkripciós faktorok mindkét gén gyökér működését szabályozhatják. Eredményeink szerint a *WRI1* esetében az embrionális fejlődéshez hasonló módon ez a szabályozás korlátozza a gén kifejeződését, míg a *LEC2* működésében az E2F szerepe megváltozott a gyökérben az embrióhoz képest. Amíg az embrióban gátolta, addig a gyökérben aktiválta a *LEC2* kifejeződését. Eredményeink arra engednek következtetni, hogy az E2F szabályozás egy adott gén esetében szövet és fejlődés specifikus módon változhat.

## **3. A növényi DREAM komplex jelenléte Arabidopsisban és repcében**

Munkánk során kimutattuk, hogy az E2FA és E2FB transzkripciós faktorok elsősorban, mint represszorok, az embriogenezis során fontos koordinációs szerepet játszanak az osztódási és differenciálódási folyamatok összehangolásában. Nem ismert ugyanakkor hogyan, és milyen fehérjékkel együttműködve hajtják végre a gátló funkciójukat. Az állatok esetében E2F és Rb fehérjéket más DNS-kötésre képes fehérjékkel együttesen, közös komplexben mutatták ki (általánosan DREAM komplex - DP, Rb, E2F And/és MuvB). Ezeknek az állati komplexeknek van egy központi, öt fehérjéből álló konzerválódott eleme, amit korábban a fonálféregben írtak le először (synthetic multivulval class B, röviden synMuvB vagy MuvB). A különböző állati modellekben a komplexek összetétele egymáshoz nagyon hasonlóknak bizonyult (Drosophila-légy dREAM/MMB, Caenorhabditis-fonálféreg- DRM, egér és ember LINC/DREAM). A komplexek pontos szerepe még nem ismert, de feltételezhetően represszor funkcióval rendelkeznek, mivel a kromatin szerkezetét befolyásoló fehérjék (pl. hiszton deacetiláz) jelenlétét mutatták ki a DREAM komplexekben. Kimutatták, hogy a DREAM komplex képes az

osztódó sejtekben kikapcsolni a differenciálódási géneket (*Drosophila* –Lee és mtsai., 2010), másrészt pedig megakadályozzák, hogy a sejtciklus gének rosszkor, pontatlanul működjenek az osztódási ciklus során (Sadasivam és deCaprio, 2013). A hasonlóságok mellett különbségeket is találtak a különböző állati komplexek összetételében, kimutatták, hogy a légy DREAM komplexében az E2F és az RBF (a légy Retinoblastoma faktora) fehérjék a MYB transzkripció faktorral közös komplexet alkot, míg az emlős sejtekben az E2F és a MYB transzkripció faktorok sohasem fordulnak elő együtt ugyanabban a komplexben (Sadasivam és deCaprio, 2013). Az *Arabidopsis*-ban több száz MYB rokon fehérjét is azonosítottak, de ezek között csak öt olyan fehérje van, amelyek strukturálisan és funkcionálisan is a legközelebb állnak az állati MYB transzkripció faktorokhoz (rendelkeznek mindhárom konzerválódott MYB doménnel, ezeket MYB3R1-5 névvel illeték (Kobayashi és mtsai., 2015). A MYB3R transzkripció faktorok szerepüket tekintve lehetnek represszorok (MYB3R3 és 5) valamint aktivátorok (MYB3R1 és 4; Kobayashi és mtsai., 2015). Eredményeink alapján mind az aktivátor MYB3R4, mind pedig a represszor MYB3R3 képes komplexbe lépni az RBF és az E2F fehérjékkel (23. ábra). Állatok esetében eddig kizárólag a represszor típusú E2F fehérjék léptek kölcsönhatásba a DREAM komponensekkel. Érdekes módon addig, amíg a fiatal osztódó levélben az aktivátor E2FB az aktivátor MYB3R4 fehérjéhez kapcsolódott, addig a már differenciálódó levelekben a represszor E2FC a represszor MYB3R3 fehérjéhez asszociálódott (23. ábra; Kobayashi és mtsai., 2015). Az aktivátor MYB3R4 specifikusan csak a sejtosztódás G2-M fázisában fejeződik ki, ami alapján ez a növényi DREAM komplex ebben az osztódási fázisban működik. Az aktivátor MYB transzkripció faktorok hiányában (*myb3r1,5* dupla mutáns) csökken a mitotikus gének aktivitása (pl. mitotikus ciklinek, *KNOLLE*), aminek köszönhetően az osztódás egyik utolsó lépése, a citokinézis hibás működését lehetett megfigyelni bennük (Haga és mtsai., 2007; Kobayashi és mtsai., 2015). Vajon ezek a TF-ok a DREAM komplexben is aktivátor szerepet játszanak vagy bizonyos gének esetében represszorként működnek az állati DREAM komplexekhez hasonlóan? Erre a kérdésre a választ egyelőre nem ismerjük. A levélfejlődés differenciálódási szakaszában a represszor MYB3R3 a szintén represszor E2FC-vel asszociálódik. Feltételezhetően, ez a komplex tartja kikapcsolt állapotban a sejtosztódási géneket a már differenciálódott levélsejtekben. Ezt a feltételezést támasztja alá, hogy a sejtosztódási gének az E2FC géncsendesített, valamint a *myb3r3,5* dupla mutáns növényekben aktívak maradnak a már kifejlődött, differenciált levelekben is (del Pozo és mtsai., 2006). Munkánk során a MIP fehérjék növényi megfelelőit találtuk meg az E2FB és az E2FC kölcsönható partnerei között, mint az ALY2-3-at (LIN9/Mip130), a TCX5-öt (LIN54/Mip120) és az MSI1-et (RBBP4 - Kobayashi és mtsai., 2015; Magyar és mtsai., 2016; valamint nem közölt eredményeink alapján). A legújabb

eredményeink alapján sikerült azonosítanunk a még hiányzó LIN37 (Mip40) és LIN52 növényi megfelelőit is, így megállapítható, hogy a MuvB (MIP) központi egység összes eleme a növényi DREAM komplexekben is megtalálható (Pettkó-Szandtner A., nem közölt eredményei alapján). Eredményeink alapján tehát megállapíthatjuk, hogy a növényekben is vannak DREAM komplexek, melyek hasonlóan az állati komplexekhez fontos szerepet játszhatnak a sejtosztódás szabályozásában valamint a differenciálódás és az osztódás koordinálásában (27. ábra). További vizsgálatokra van szükség ahhoz, hogy jobban megismerjük ezeknek a DREAM komplexeknek a működését és megértsük a növényi fejlődésben betöltött szerepüket.

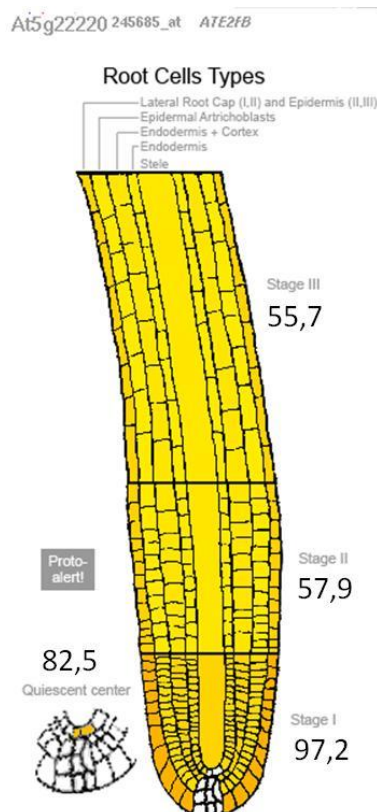


**27. ábra: A növényi sejtciklus és a nyugalmi fázis (G0) szabályozása DREAM-jellegű komplexekkel.**

Az osztódó sejtek G1 fázisa során a korai sejtciklus szabályozó gének működését az E2FB-DPA/B-RBR komplex gátolja. Az RBR CYCD-CDKA;1 általi foszforilációja révén lehetővé válik az aktív E2F-DPA/B heterodimer felszabadulása (feltehetően az aktivátor E2FA és E2FB tartalmú), ami beindítja a korai sejtciklus szabályozó gének transzkripcióját. Később a represszor E2FC-nek szerepe lehet a korai sejtciklus szabályozó gének transzkripciójának gátlásában, melyben a DEL TF-ok is részt vehetnek, melyek nem tipikus E2F TF-ok, monomerként RBR és DP független úton működnek (Vlieghe és mtsai., 2005). A G1, S és a korai G2 fázis során a késői sejtciklus szabályozó gének transzkripcionálisan gátolva vannak egy represszor típusú DREAM fehérje komplex által, amely MYB3R-t, RBR-t és MuvB-szerű központi egységet tartalmaz. A késői G2 során ez a gátló komplex kicserélődik a célgének promóterén egy aktivátor DREAM komplexre (aktivátor típusú MYB3R-t – MYB3R-4, E2FB-t, RBR-t és MuvB-szerű központi elemet tartalmaz), amely pozitív visszacsatoláson keresztül auto-aktiválódik, és ez lehetővé teszi a késői sejtciklus szabályozó gének transzkripcióját. Az osztódás utáni sejtekben a késői sejtciklus szabályozó géneket egy másik represszor funkcióval rendelkező DREAM, MYB3R-E2F komplex tartja csendesített állapotban (amely represszor típusú MYB3R-t, E2FC-t, RBR-t és MuvB-szerű központi egységet tartalmaz; az ábrát Magyar Z. és mtsai., 2016 munkája alapján készítettük).

#### **4. A repce és az Arabidopsis E2FB fehérjék egymáshoz nagyon hasonló szerkezetűek és funkciójúak**

Munkánk során megvizsgáltuk mennyire hasonlít a repce E2FB az Arabidopsis rokonához, illetve hogy a repce E2FB genomikus klónja az Arabidopsisban milyen kifejeződést mutat az endogén E2FB-hez képest. Arra is kíváncsiak voltunk, hogy milyen fehérjékkel lép kölcsönhatásba az Arabidopsis és a repce E2FB. Azonosítottuk és izoláltuk a repce egyik E2FB klónját (24. ábra). Transzlációs klónt hoztunk létre vele a saját repce promóterének az ellenőrzése alatt és a vYFP fluoreszcens fehérjével fúzióban, amit Arabidopsisba transzformáltunk. Számos független transzgenikus vonalat hoztunk létre, ahol megvizsgáltuk a repce fehérje kifejeződését és az erősebben kifejeződő vonalakban mikroszkóp alatt megnéztük a repce E2FB fehérje gyökérmerisztéma megjelenését. Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy az Arabidopsis és a repce E2FB fehérjék nagyon hasonló expressziós mintázatot és sejtmagi lokalizációt mutatnak a transzgenikus Arabidopsis növények gyökerében, ráadásul mindkét növényi E2FB fehérje fluoreszcens jele a sejtosztódásból már kilépett és megnyúló gyökér sejtekben a legerősebb (25. ábra). Nem készítettünk riporter vonalakat az E2FB promóterekkel, így nem tudjuk eldönteni, hogy a hasonló expressziós mintázat a promótereknek köszönhető, vagy a fehérje felhalmozódása poszt-transzkripcionális szabályozásoknak az eredménye. Az E2FB fehérje gyökér lokalizációja ugyanakkor meglepő, különösen a transzkripció eredmények fényében, ahol a gyökércsúcstól távolódva gyengülő expressziót lehet megfigyelni (28. ábra).



## 28. ábra: Az Arabidopsis *E2FB* gén gyökérmerisztéma specifikus kifejeződése.

Az eFP browser segítségével ábrázoltuk az *E2FB* gén gyökérmerisztéma specifikus expressziós mintázatát (Winter és mtsai., 2007). Az *E2FB* a laterális gyökérsüveg sejtekben mutat magas expressziót és a gyökércsúcsból távolodva gyengül a kifejeződése. A gyökér jobboldalán található értékek a külső sejtrétegre vonatkozó expressziós értékek (oldalsó gyökérsüveg sejtek), amelyek az affimatrix DNS-chip adataiból származnak, míg a baloldalon a QC (sárgával jelölt két sejt) sejtjeiben kimutatható *E2FB* expressziós adat látható. A sötétebb sárga színárnyalat erősödő expressziót jelez.

Mind a repce, mind pedig az Arabidopsis *E2FB* fehérje esetében valamilyen poszt-transzkripciós és/vagy poszt-transzlációs mechanizmus befolyásolhatja a fehérje felhalmozódását. Korábban kimutattuk, hogy az *E2FB* szabályozza az *S6K* működését, amely fontos szerepet játszik a fehérje szintézisben és az *S6K* képes befolyásolni az *E2FB* mennyiségét és aktivitását is (Henriques és mtsai., 2010; Henriques és mtsai., 2013). Kimutattuk azt is, hogy az *E2FB* az RBR fehérje szigorú ellenőrzése alatt áll és az *E2FB* autoregulációs mechanizmusok révén képes aktiválni az RBR gén működését és aktivitását is (Őszi és mtsai., 2020), és elképzelhető, hogy az RBR fehérje az *E2FB*-vel komplexben stabilizálódik. Ennek köszönhetően meglepő módon az *E2FB* kifejeződésének a fokozásával (pl. túltermeltetésével) sokkal inkább gátlódott a sejtosztódás, mivel a még fiatal növényi levelekben több *E2FB*-RBR komplex formálódott, mint szabad *E2FB* (Őszi és mtsai., 2020). Az RBR fehérje a gyökérben egyenletesen magas mennyiségben található meg (Magyar és mtsai., 2012). Érdekes módon, az *E2FA* fehérje



gyökérmerisztéma megoszlása az E2FB-vel ellentétes, az osztódó sejtekben halmozódik fel a legnagyobb mennyiségben, míg a megnyúlt gyökérsejtekben csökken a mennyisége (Magyar és mtsai., 2012). Mindezek alapján az RBR a különböző gyökérszónákban különböző E2F fehérjékkel léphet komplexbe. Egyelőre még nem tudjuk, hogy pontosan mi szabályozza ezeknek a komplexeknek a különböző gyökérszónákban történő kialakulását és fennmaradását és ezek a különböző E2F-RBR komplexek hogyan szabályozzák a gyökér növekedését. Redukált kifejeződésű RBR mutáns gyökerekben (mesterséges mikroRNS az RBR ellen, röviden amiRBR; Horváth és mtsai., 2017) az E2FA mutációjával jelentős mértékben csökkenteni lehetett a spontán sejthalál kialakulását a gyökérsüveg és a szállító szövet proximális gyökérsejtjeiben, míg az E2FB mutációja erre nem volt képes (Horvath és mtsai., 2017). Ezek alapján a két aktivátor E2F gyökérmerisztéma szerepe csak részben átfedő. Az E2FB fehérje gyökérmerisztéma megjelenéséből arra következtetünk, hogy az E2FB-nek fontos szerepe lehet a gyökérben a sejtmeinyulás és differenciálódás szabályozásában. Korábban kimutattuk, hogy az E2FB fehérje stabilitására pozitív hatással van a növényi növekedési hormon az auxin (Magyar és mtsai., 2005). Az auxin fontos szerepet játszik a gyökér fejlődésében, és a sejtek növekedésében és osztódásában egyaránt. Hogyan szabályozza az auxin az E2FB gyökér működését valamint az E2FB szabályozza-e az auxin megnyilvánulását és hatását? Ezeknek a kérdéseknek a megválaszolására további vizsgálatokra van szükségünk. Munkánk során megállapítottuk, hogy a repce és az Arabidopsis E2FB fehérjék egymáshoz jelentős mértékben hasonlítanak és nagyon hasonló fehérje komponensekkel lépnek komplexbe. Legerősebb kölcsönható partnereik az RBR, a DPA és DPB fehérjék bizonyultak, a repce E2FB-vel kölcsönhatott fehérjék között pedig a növényi DREAM komplex egyik komponensét, az ALY3 fehérjét is ki tudtuk mutatni (11. táblázat). Ez alapján a repce E2FB hasonló tulajdonságokkal bír, mint az Arabidopsis E2FB. A mi eredményeink is alátámasztják, hogy a kétszikűekben az Arabidopsishoz hasonló E2F-RBR szabályozási rendszer működik. Ezzel szemben az egyszikűekben számos különbség figyelhető meg. Az egyszikű modellben, a kukoricában nem találtak egyértelmű E2FA és E2FB homológot, hanem négy, mind az *E2FA*-hoz, mind az *E2FB*-hez azonos mértékben hasonlító gént találtak, melyeket *E2Fa/b*-nek nevezték el. Az egyszikű kukorica DPA-val sem rendelkezik, ellenben három DPB-t tartalmaz és egy DPC-t, amely csupán 23 %-os hasonlóságot mutat az Arabidopsis DP-kel, melyekkel nem csoportosítható, így az egyszikű DP-k egy új csoportját hozza létre. Az Arabidopsishoz hasonlóan a kukorica is rendelkezik DEL fehérjékkel, ráadásul szintén három *DEL* gént azonosítottak a genomjában. Azonban mind a három *DEL* gén az Arabidopsis *DEL1*-el mutat nagyobb hasonlóságot, így ezek a *DEL1a*, *DEL1b* és *DEL1c* elnevezést kapták (Sánchez-Camargo és mtsai., 2020). Kukoricában

az RB fehérje két típusát találták meg, az RBR1-et és az RBR3-at. Az RBR3 kifejeződése az E2F-RBR1 útvonal által szabályozott. Szövetkultúrában kimutatták, hogy az RBR1 aktivitásának hiányában az RBR3 aktiválódik, ami egy különleges kompenzációs mechanizmus jelenlétére utal (Sabelli és Larkins, 2006). DREAM-jellegű komplexet növényekben egyelőre csak Arabidopsisban azonosítottak (Kobayashi és mtsai., 2015).

# ÖSSZEFOGLALÁS

A növényi növekedést meghatározó molekuláris szabályozó rendszerek megismerése a növénybiológia jelenleg is intenzíven kutatott területe, megértésük nemcsak tudományos, hanem gyakorlati szempontból is korunk egyik legizgalmasabb növénybiológiai problémája. A fejlődő növényekben a sejtciklus alatt a sejtosztódási gének koordinált működését a jelenleg elfogadott modell szerint egy az evolúció során konzerválódott transzkripcionális mechanizmus irányítja, melyet a benne résztvevő szabályozó elemekről E2F-RB-nek neveztek el, amely elsősorban a sejtosztódási gének be és kikapcsolásában vesz részt (Magyar és mtsai., 2008). Arabidopsisban egyetlen RB rokon fehérjét azonosítottak (RBR), amely három E2F transzkripciós faktorról (E2FA, E2FB, E2FC) képes komplexet alkotni (Magyar és mtsai., 2016). Az E2FA és az E2FB transzkripciós faktorok túltermeltetése növeli az osztódások számát, míg az E2FC esetében a túltermeltetés gátolja a sejtosztódást a posztembrionális fejlődés során. Ezek alapján az E2FA és E2FB transzkripciós faktorokat aktivátornak, az E2FC-t represszor típusúnak tekintjük (De Veylder és mtsai., 2002; del Pozo és mtsai., 2006; Magyar és mtsai., 2005; Magyar és mtsai., 2012; Sozzani és mtsai., 2006). A növényi sejtosztódás az embrió fejlődése során is egy szigorúan szabályozott folyamat, ahol az osztódások irányítottan, egy meghatározott „koreográfia” szerint valósulnak meg. Az embriógenesis során a sejtosztódási és az érési gének koordináltan fejeződnek ki, de nem igazán ismert még, hogy a fejlődő magban pontosan mi hangolja össze ezeket a folyamatokat.

A növényi magfejlődés két, egymást követő szakaszra osztható; az első a morfogenezis, amelyben a sejtosztódás a fő esemény, a második a mag érési fázisa, melyben az embrió eléri végső méretét és ahol a tartalék tápanyagok felhalmozódnak (Holdsworth és mtsai., 2008; Lau és mtsai., 2012; Sun és mtsai., 2010). Az embriógenesis utolsó lépése a szárazság tolerálására való képesség megszerzése és a megnyugalmi állapot kialakulása (Devic és Roscoe, 2016). Mezőgazdasági szempontból ezek mind igen fontos folyamatok, amelyek meghatározzák a képződő magok minőségét. A mag érésének genetikai szabályozásában a LEC1 és három egymással rokon B3 típusú TF, a LEC2, a FUS3 és az ABI3 játszanak kulcsszerepet (Lotan és mtsai., 1988; Stone és mtsai., 2001; Luerksen és mtsai., 1988; Giraudat és mtsai., 1992). Míg a B3 TF-ok együttesen aktiválják a tartalékfehérje gének expresszióját (Kroj és mtsai., 2003), addig a LEC2 TF szabályozza a WRI1 TF kifejeződését is, melynek célgénjei a zsírsavszintézisben szerepet játszó gének (Baud és mtsai., 2007).

Az eukarióta sejtosztódás szabályozásának legújabb felfedezése a DREAM, amely egy több komponensből álló fehérje komplex. Ezt a transzkripciós faktorokat magába foglaló fehérje komplexet az állati modell élőlényekben mutatták ki először és összetétele a különböző állati fajok ellenére, meglepően hasonlóan bizonyult. Funkcionális jellemzése során megállapították, hogy elsődleges funkciója a represszió: differenciálódási géneket kapcsol ki osztódó sejtekben, és megakadályozza, hogy a korai illetve késői sejtciklus gének rosszkor, pontatlanul működjenek a sejtciklus során (Sadasivam és deCaprio, 2013). A növényekben számos olyan transzkripciós faktor megtalálható, amely növényi megfelelője az állati DREAM komplex komponenseinek.

Munkánk során célul tűztük ki az aktivátor E2F TF-ok funkcionális jellemzését a mag és az embrió fejlődése során, valamint az állati DREAM komplexhez hasonló fehérje komplexek felkutatását Arabidopsisban. Összehasonlítottuk a repce és az Arabidopsis E2FB fehérjét, hogyan jelennek meg az Arabidopsis gyökérben és milyen fehérjékkel lépnek komplexbe. Kísérleti eredményeink alapján a következő főbb következtetéseket vonhatjuk le:

1, Az aktivátor E2FA és E2FB szimpla és dupla mutánsok érett embrióiban a sejtszám a kontrollhoz képest nem változik meg. A fejlődő embrióban a két aktivátor E2F funkciójára ugyan szükség van a sejtciklus szabályozó gének teljes, maximális kifejeződéséhez, de a csökkent expresszió ellenére a sejtosztódásban nem láttunk lényeges különbséget a kontrollhoz képest. Ezek alapján, az embriógenézis során az aktivátor E2F-ek nem esszenciális komponensei a sejtosztódás lépésnek.

2, Az aktivátor E2F-ek a sejtciklus gének represszoraiként működnek a mag nyugalmi fejlődési szakaszában. Feltételezzük, hogy mindkét E2F az RBR fehérjével hoz létre represszor komplexet és ez az E2FC-vel kiegészülve fontos szerepet játszhat a mag nyugalmi állapotának a kialakításában. Láttunk némi eltérést is az E2FA és az E2FB működése között: mindkettő gátolja az S fázis specifikus szabályozó gének kifejeződését, míg az M fázis specifikus *CDKB1;1* expresszióját egymással ellentétesen szabályozzák; az E2FA gátolja, míg az E2FB aktiválja a gén kifejeződését.

3, Szemben az E2FA-val és az RBR-rel az E2FB transzkriptum és fehérje a kiszáradt, nyugvó magban is detektálható. Ez alapján az E2FB RBR-független, egyelőre még nem ismert szabályozó szereppel bírhat ebben a magfejlődési stádiumban.

4, A LEC2 és a WRI1 TF-ok promóterében található E2F kötőhely mutációja ezeknek a géneknek az idő előtti, már a magfejlődés osztódási fázisa során bekövetkező aktivációjához

vezet. A kulcsfontosságú magérési gének, mint a *LEC1-2*, *ABI3*, *FUS3* és *WR11* expressziója fokozódott az *e2fa-2/e2fb-1* dupla mutáns embrióban. Eredményeink alapján az E2F-ek a magérési gének negatív szabályozói, de nem csak az osztódó embrióban korlátozzák azok működését, hanem a mag érési fázisa során is képesek befolyásolni az expressziós szintjüket (mintegy beállítják, finoman hangolják a kifejeződésüket).

5, Az E2F TF-ok a *LEC2* gén működését közvetlenül, fejlődési fázisra specifikus módon szabályozhatják. Kimutattuk, hogy az E2FA TF a mag érési fázisa során kötődik a *LEC2* gén promóteréhez, mégpedig az E2F kötőhelyhez specifikusan.

6, A mag legfontosabb tartalék fehérjéi, a 2S albumin és a 12S globulin idő előtt felhalmozódnak, már a magfejlődés osztódási fázisa során az *e2fa* és *e2fb* szimpla és dupla mutánsokban. A különböző funkcióvesztéses *e2fa* és *e2fb* mutánsokban tapasztalt tartalék fehérje felhalmozódása alapján feltételezzük, hogy az E2F-ek az RBR-rel komplexben megakadályozzák a tartalék fehérjék korai, idő előtti felhalmozódását.

7, Mind a két elsősorban embrionális gén, a *LEC2*, és a *WR11* az Arabidopsis gyökérben is kifejeződik, legerősebben a gyökérmerisztéma összejt régióban. Az E2F TF-ok a *WR11* kifejeződését akárcsak az embrióban, a gyökérben is gátolják, de a *LEC2* működését a gyökérben az embrióval ellentétesen szabályozzák. Ez alapján az E2F szabályozás egy adott gén esetében a fejlődési stádiumtól függően változhat.

8, Kimutattuk, hogy a növényekben is vannak DREAM jellegű fehérje komplexek, amelyek összetétele hasonló az állati DREAM komplexekhez. Szemben az állatokkal azonban, a növényekben található represszor E2FC mellett, az aktivátor E2FB is részt vesz ilyen típusú komplexek formálásában. A fiatal osztódó levélben az E2FB az aktivátor MYB3R4 fehérjéhez kapcsolódik, míg a már differenciálódó levelekben a represszor E2FC a represszor MYB3R3 fehérjéhez asszociálódik. A MuvB (MIP) központi egység összes eleme megtalálható a növényi DREAM komplexekben.

9, A repce E2FB genomikus klónjával transzgenikus Arabidopsis növényeket hoztunk létre. A gyökérmerisztémában a repce és az Arabidopsis E2FB fehérjék nagyon hasonló expressziós mintázattal rendelkeznek; az E2FB mindkét esetben sejtmagi lokalizációjú és a poszt-mitotikus sejtekben halmozódik fel nagyobb mennyiségben. Ez alapján az E2FB fontos szerepet játszhat a sejtmegnyúlásban és a differenciálódásban is. A repce E2FB fehérje kölcsönhat az RBR, a DPA és DPB fehérjékkel, valamint a DREAM komplex egyik komponensével, az ALY3 fehérjével is.

Mindez arra enged következtetni, hogy a repce E2FB az Arabidopsis E2FB fehérjéhez hasonló tulajdonságokkal rendelkezik.

Összesítve tehát az eredményeinket megállapíthatjuk, hogy az E2F szabályozás egy olyan koordinációs mechanizmus központi eleme, amely a fejlődő magban elsősorban az osztódási és az érési folyamatok összehangolásában játszik meghatározó szerepet, míg meglepő módon a sejtosztódást aktiváló funkciója kevésbé hangsúlyos. Az E2F-RBR szabályozás részletesebb ismerete lehetőséget biztosít a mag fejlődését és érését meghatározó molekuláris folyamatok felderítésére. Napjainkban a modern mezőgazdaság talán legnagyobb kihívása előtt áll, hogyan képes élelemmel ellátni az egyre növekvő népességet a megváltozott éghajlati körülmények között. Ezeknek az ismereteknek a révén, nemcsak a molekuláris modell növényben, de hosszabb távon a mezőgazdaságilag fontos növények esetében is lehetőséget biztosít a terméshozam mennyiségének és minőségének a javítására. Úgy gondoljuk, hogy az általunk feltárt szabályozási mechanizmus az E2F-RBR és a magfejlődésben szerepet játszó gének között kiindulási alapul szolgálhat a nemesítési programok számára is.

## SUMMARY

Plant growth has exceptional importance for human civilization, yet we are only starting to gain an understanding of its mechanisms. It is well known, that plant growth is restricted to meristematic regions where sufficient cells need to be continuously generated to build the developing plant body. The key factor in growth is the duration of cell proliferation and the timing of the exit from proliferation to cell expansion and differentiation. The current view is that entering and leaving the cell cycle are regulated by an evolutionarily conserved transcriptional mechanism called E2F-RB (Magyar et al., 2008). In Arabidopsis, a single RB-related protein (RBR) has been identified and that can form complexes with three E2F transcription factors (E2FA, E2FB, E2FC, Magyar et al., 2016). Plant E2Fs have been classified as transcriptional activators (E2FA and E2FB), or transcriptional repressor (E2FC), however most of these data were derived from overexpression studies (De Veylder et al., 2002; del Pozo et al., 2006; Magyar et al., 2005; Sozzani et al., 2006; Magyar et al., 2012).

Cell proliferation in plants is strongly regulated during embryo development, where oriented divisions take place during morphogenesis in a highly predictable manner. Morphogenesis is followed by maturation, but how genes involved in cell proliferation and maturation are coordinated during embryo and seed development is not exactly known.

Seed development of plants consist of two consecutive stages; first is morphogenesis, where cell division is the major event; second is maturation phase, where the embryo reaches its final size and seed storage reserves accumulate (Holdsworth et al., 2008; Lau et al., 2012; Sun et al., 2010). The final step of embryogenesis is to develop desiccation tolerance and seed dormancy (Devic and Roscoe, 2016). From an agricultural point of view, these are all very important processes that determine the quality of seeds. Key genetic factors controlling seed maturation are LEC1 TF and three related B3 domain transcription factors LEC2, FUS3 and ABI3 (Lotan et al., 1988; Stone and et al., 2001; Luerksen et al., 1988; Giraudat et al., 1992). While B3 TFs together activate the expression of seed storage reserve protein genes (Kroj et al., 2003), LEC2 TF regulates the expression of WRI1 TF, which target genes are involved in fatty acid synthesis (Baud et al., 2007).

Recently, the dimerization partner (DP), RB, E2F and the MuvB (DREAM) multiprotein complex emerged as a novel unifying regulator in the control of animal cell cycle. Changes in the composition of various animal DREAM complexes shift the balance from quiescence towards proliferation and determine the expression levels of mitotic genes (Sadasivam and

DeCaprio, 2013). Homologues of DREAM components have been identified in plants but whether they form DREAM-like complexes have not been determined yet.

We aimed to functionally characterize the activator E2F TFs during seed and embryo development. We were particularly curious how important the transcriptional activator function of these E2Fs during embryogenesis or they operate as repressors in complex with RBR. Interestingly, their role as cell cycle activator was found to be non-essential, but their function to coordinate proliferation with maturation was discovered here. Among activator E2Fs only E2FB was found to form complex with DREAM components similarly to the repressor E2FC. E2FB from rapeseed was identified, and it was found to be structurally and functionally very similar to the Arabidopsis E2FB.

In summary, based on our results we concluded:

1, In spite of the partial requirement of these activator E2Fs to fully promote cell cycle genes, cell number in the mature embryos of the single and double E2FA and E2FB mutants was comparable with the control WT. These findings demonstrate that E2FA and E2FB are only partially required for the expression of cell cycle genes during embryonic cell division, and the reduced expression of these cell cycle genes does not manifest in reduced cell proliferation.

2, We show here that cell cycle genes still express even after the completion of the proliferation phase in the developing seeds of double *e2fa-2/e2fb-1* mutant. This shows that these two E2Fs function as repressors on cell cycle genes as seed development progresses into the maturation phase. In the *e2fa-2/e2fb-1* double mutant embryo, however, we have not seen significant increase in cell number, indicating the requirement for additional components besides E2FA and E2FB downstream of RBR, likely E2FC, to repress cell proliferation during the maturation phase of embryogenesis. E2FA and E2FB regulates S-phase genes in redundant manner, but only E2FB activates the expression of the G2-M phase specific *CDKB1;1* gene.

3, Contrary to E2FA and RBR, both the transcript and the protein of E2FB could be detected in dry seeds. Based on these findings, E2FB may have an unknown, but RBR-independent regulatory role at this stage of seed development.

4, We found that both *LEC* genes were prematurely up-regulated in the *e2fa-2/e2fb-1* double mutant. In addition, we show that the *LEC2* gene could be directly regulated by E2Fs through an E2F-binding site during the maturation phase. Additionally, *LEC2* expression was also prematurely activated in the *e2fb-1* mutant suggesting that E2FB regulates *LEC2* but earlier than



E2FA. In agreement, expression of *LEC2* became de-regulated when its E2F-binding sequence in its promoter region was mutated, and showed a nearly maximum level of expression already during the morphogenic developmental phase.

5, The most important seed storage reserve proteins, 2S albumin and 12S globulin, became prematurely accumulated at the proliferating phase of seed development in the *e2fa* and *e2fb* simple and double mutants. Based on these data, we hypothesize that E2Fs in complex with RBR prevent premature accumulation of seed storage proteins.

6, The embryonic *LEC2* and *WRI1* genes were found to be expressed in the root meristem. Interestingly, the *LEC2* is differently regulated by E2Fs in the embryo and in the root; repressor in the former, and activator in the later. Based on these findings, the regulation of a specific gene by E2Fs could depend on developmental context.

7, We purified DREAM-like protein complexes from plants, consisting of components similar with animal DREAM complexes. However, contrary to animals, where exclusively repressor E2Fs form DREAM complexes, in Arabidopsis besides the repressor E2FC, the activator E2FB was also identified in complex with DREAM components. In young dividing leaf, E2FB binds to activator MYB3R4 protein, whereas in the already differentiated leaves, repressor E2FC associates with repressor MYB3R3 protein indicating functional differences between these E2F containing DREAM complexes.

8, Transgenic Arabidopsis plants were generated with the rapeseed E2FB genomic clone. Rapeseed and Arabidopsis E2FB proteins show very similar expression patterns in the root meristem. Interestingly, both plant E2FB accumulate at the highest level in post-mitotic root cells. Based on this, E2FB may also play an important role in cell elongation and differentiation. By identifying the interactors of rapeseed E2FB protein we found RBR, DPA, and DPB as well as ALY3 proteins. All these data suggest that rapeseed E2FB has very similar properties to the Arabidopsis E2FB protein.

It is paramount to advance plant biotechnology to further boost biomass production and crop yield. To do this effectively, it will be necessary to understand how the molecular machinery that determines yield parameters operates. We can conclude here that E2F-RBR regulation is central in coordinating different developmental phases during seed development and the RBR-E2F network is important both for the extent of seed growth and accumulation of

seed storage reserves and should be considered as an important breeding target to increase crop yield.

## IRODALOMJEGYZÉK

- Abe, M., Katsumata, H., Komeda, Y., Takahashi, T. (2003) Regulation of shoot epidermal cell differentiation by a pair of homeodomain proteins in Arabidopsis. *Development* 130(4):635-43.
- Abraham, Z., del Pozo, J.C. (2006) Ectopic Expression of E2FB, a Cell Cycle Transcription Factor, Accelerates Flowering and Increases Fruit Yield in Tomato. *J Plant Growth Regul.* 31:11–24.
- Aida, M., Ishida, T., Tasaka, M. (1999) Shoot apical meristem and cotyledon formation during Arabidopsis embryogenesis: interaction among the CUP-SHAPED COTYLEDON and SHOOT MERISTEMLESS genes. *Development* 126:1563–70.
- Aida, M., Beis, D., Heidstra, R., Willemsen, V., Blilou, I., Galinha, C., Nussaume, L., Noh, Y.S., Amasino, R., Scheres, B. (2004) The PLETHORA genes mediate patterning of the Arabidopsis root stem cell niche. *Cell* 119:109–20.
- Baud, S., Boutin, J.P., Miquel, M., Lepinie, L., Rochat, C. (2002) An integrated overview of seed development in Arabidopsis thaliana ecotype WS. *Plant Physiology and Biochemistry.* 40(2):151-160.
- Baud, S., Mendoza, M.S., To, A., Harscoët, E., Lepiniec, L., Dubreucq, B. (2007) WRINKLED1 specifies the regulatory action of LEAFY COTYLEDON2 towards fatty acid metabolism during seed maturation in Arabidopsis. *Plant J.* 50, 825–838.
- Baud, S., Lepiniec, L. (2009) Regulation of de novo fatty acid synthesis in maturing oilseeds of Arabidopsis. *Plant Physiol. Biochem.* 47:448-455.
- Bennett, T., Scheres, B. (2010) Root development-two meristems for the price of one? *Curr Top Dev Biol.* 91:67-102.
- Berckmans, B., Lammens, T., Van Den Daele, H., Magyar, Z., Bögre, L., De Veylder, L. (2011a) Light-dependent regulation of DEL1 is determined by the antagonistic action of E2Fb and E2Fc. *Plant Physiol.* 157(3):1440-51.
- Berckmans, B., Vassileva, V., Schmid, S.P., Maes, S., Parizot, B., Naramoto, S., Magyar, Z., Alvim Kamei, C.L., Koncz, C., Bogre, L., Persiau, G., De Jaeger, G., Friml, J., Simon, R.,

Beeckman, T., and De Veylder, L. (2011b) Auxin-dependent cell cycle reactivation through transcriptional regulation of Arabidopsis E2Fa by lateral organ boundary proteins. *Plant Cell*. 23, 3671-3683.

Bhalla, P.L., Singh, MB. (2008) Agrobacterium-mediated transformation of *Brassica napus* and *Brassica oleracea*. *Nat Protoc*. 3(2):181-9.

Black, E.P., Hallstrom, T., Dressman, H.K., West, M., Nevins, J.R. (2005) Distinctions in the specificity of E2F function revealed by gene expression signatures. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102(44):15948-53.

Boniotti, M.B., Gutierrez, C. (2001) A cell-cycle-regulated kinase activity phosphorylates plant retinoblastoma protein and contains, in Arabidopsis, a CDKA/cyclin D complex. *Plant J*. 28(3):341-50.

Borghi, L., Gutzat, R., Fütterer, J., Laizet, Y., Hennig, L., Gruissem, W. (2010) Arabidopsis RETINOBLASTOMA-RELATED is required for stem cell maintenance, cell differentiation, and lateral organ production. *Plant Cell*. 22(6):1792-811.

Borhidi, A. (1995) A zárvatermők fejlődéstörténeti rendszertana.

Boudolf, V., Lammens, T., Boruc, J., Van Leene, J., Van Den Daele, H., Maes, S., Van Isterdael, G., Russinova, E., Kondorosi, E., Witters, E., De Jaeger, G., Inzé, D., De Veylder, L. (2009) CDKB1;1 forms a functional complex with CYCA2;3 to suppress endocycle onset. *Plant Physiol*. 150(3):1482-93.

Brandeis, M., Rosewell, I., Carrington, M., Crompton, T., Jacobs, A.M., Kirk, J., Gannon, J., Hunt, T. (1998) Cyclin B2-null mice develop normally and are fertile whereas cyclin B1-null mice die in utero. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95: 4344–4349.

Braybrook, S.A., Stone, S.L., Park, S., Bui, A.Q., Le, B.H., Fischer, R.L., Goldberg, R.B., Harada, J.J. (2006) Genes directly regulated by LEAFY COTYLEDON2 provide insight into the control of embryo maturation and somatic embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103(9):3468-73.

Braybrook, S.A., Harada, J.J. (2008) LECs go crazy in embryo development. *Trends Plant Sci*. 13(12):624-30.

- Byrne, M.E., Barley, R., Curtis, M., Arroyo, J.M., Dunham, M., Hudson, A., Martienssen, R.A. (2000) Asymmetric leaves1 mediates leaf patterning and stem cell function in Arabidopsis. *Nature* 408:967–71.
- Carbonero, P., Iglesias-Fernández, R., Vicente-Carbajosa, J. (2017) The AFL subfamily of B3 transcription factors: evolution and function in angiosperm seeds. *Journal of Experimental Botany* 68(4):871–880.
- Cardoza, V., Stewart, C.N. Jr. (2006) Canola (*Brassica napus* L.). *Methods Mol Biol.* 343:257-66.
- Cernac, A., Benning, C. (2004) WRINKLED1 encodes an AP2/EREB domain protein involved in the control of storage compound biosynthesis in Arabidopsis. *Plant J.* 40, 575–585.
- Cernac, A., Andre, C., Hoffmann-Benning, S., Benning, C. (2006) WRI1 is required for seed germination and seedling establishment. *Plant Physiol.* 141(2):745-57.
- Chen, Z., Hafidh, S., Poh, S.H., Twell, D., Berger, F. (2009) Proliferation and cell fate establishment during Arabidopsis male gametogenesis depends on the Retinoblastoma protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106(17):7257-62.
- Chen, Z., Higgins, J.D., Hui, J.T., Li, J., Franklin, F.C., Berger, F. (2011) Retinoblastoma protein is essential for early meiotic events in Arabidopsis. *EMBO J.* 30(4):744-55.
- Cheng, F., Liu, S., Wu, J., Fang, L., Sun, S., Liu, B., Li, P., Hua, W., Wang, X. (2011) BRAD, the genetics and genomics database for Brassica plants. *BMC Plant Biol.* 11:136.
- Clough, S.J., Bent, A.F.(1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16(6):735-43.
- Collins, C., Dewitte, W., Murray, J.A. (2012) D-type cyclins control cell division and developmental rate during Arabidopsis seed development. *J Exp Bot.* 63(10):3571-86.
- Coudreuse, D., Nurse, P. (2010) Driving the cell cycle with a minimal CDK control network. *Nature* 468(7327):1074-9.
- Curaba, J., Moritz, T., Blervaque, R., Parcy, F., Raz, V., Herzog, M., Vachon, G. (2004) AtGA3ox2, a key gene responsible for bioactive gibberellin biosynthesis, is regulated during

embryogenesis by LEAFY COTYLEDON2 and FUSCA3 in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 136(3):3660-9.

de Jager, S.M., Scofield, S., Huntley, R.P., Robinson, A.S., den Boer, B.G., Murray, J.A. (2009) Dissecting regulatory pathways of G1/S control in Arabidopsis: common and distinct targets of CYCD3;1, E2Fa and E2Fc. *Plant Mol Biol.* 71(4-5):345-65.

De Veylder, L., Beeckman, T., Beemster, G.T., de Almeida, E.J., Ormenese, S., Maes, S., Naudts, M., Van Der Schueren, E., Jacqumard, A., Engler, G., Inzé, D. (2002) Control of proliferation, endoreduplication and differentiation by the Arabidopsis E2Fa-DPa transcription factor. *EMBO J.* 21(6):1360-8.

De Veylder, L., Beeckman, T., Inzé, D. (2007) The ins and outs of the plant cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8(8):655-65.

Dean Rider, S. Jr, Henderson, J.T., Jerome, R.E., Edenberg, H.J., Romero-Severson, J., Ogas, J. (2003) Coordinate repression of regulators of embryonic identity by PICKLE during germination in Arabidopsis. *Plant J.* 35: 33–43.

del Pozo, J.C., Boniotti, M.B., Gutierrez, C. (2002) Arabidopsis E2Fc functions in cell division and is degraded by the ubiquitin-SCF (AtSKP2) pathway in response to light. *Plant Cell.* 14(12):3057-71.

del Pozo, J.C., Diaz-Trivino, S., Cisneros, N., Gutierrez, C. (2006) The balance between cell division and endoreplication depends on E2FC-DPB, transcription factors regulated by the ubiquitin-SCF<sup>SKP2A</sup> pathway in Arabidopsis. *Plant Cell.* 18(9):2224-35.

Desvoves, B., Ramirez-Parra, E., Xie, Q., Chua, N.H., Gutierrez, C. (2006) Cell type-specific role of the retinoblastoma/E2F pathway during Arabidopsis leaf development. *Plant Physiol.* 140(1):67-80.

Devic, M., Roscoe, T. (2006) Seed maturation: Simplification of control networks in plants. *Plant Sci.* 252:335-346.

Dewitte, W., Murray, J.A. (2003) The plant cell cycle. *Annu Rev Plant Biol.* 54:235-64.

Ebel, C., Mariconti, L., Grussem, W. (2004) Plant retinoblastoma homologues control nuclear proliferation in the female gametophyte. *Nature* 429(6993):776-80.

- Espinosa-Ruiz, A., Saxena, S., Schmidt, J., Mellerowicz, E., Miskolczi, P., Bakó, L., Bhalerao, R.P. (2004) Differential stage-specific regulation of cyclin-dependent kinases during cambial dormancy in hybrid aspen. *Plant J.* 38(4):603-15.
- Fischer, M., DeCaprio, J.A. (2015) Does *Arabidopsis thaliana* DREAM of cell cycle control? *EMBO J.* 34(15):1987-9.
- Focks, N., Benning, C. (1998) wrinkled1: A Novel, Low-Seed-Oil Mutant of *Arabidopsis* with a Deficiency in the Seed-Specific Regulation of Carbohydrate Metabolism. *Plant Physiol.* 118: 91±101.
- Friml, J., Vieten, A., Sauer, M., Weijers, D., Schwarz, H., Hamann, T., Offringa, R., Jürgens, G. (2003) Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis*. *Nature* 426:147–53
- Gazzarrini, S., Tsuchiya, Y., Lumba, S., Okamoto, M., McCourt, P. (2004) The transcription factor FUSCA3 controls developmental timing in *Arabidopsis* through the hormones gibberellin and abscisic acid. *Dev Cell.* 7(3):373-85.
- Giraudat, J., Hauge, B.M., Valon, C., Smalle, J., Parcy, F., Goodman, H.M. (1992) Isolation of the *Arabidopsis* ABI3 gene by positional cloning. *Plant Cell.* 4(10):1251-61.
- Goldberg, R.B., de Paiva, G., Yadegari, R. (1994) Plant embryogenesis: zygote to seed. *Science* 266(5185):605-14.
- Gonzalez, N., Beemster, G.T., Inzé, D. (2009) David and Goliath: what can the tiny weed *Arabidopsis* teach us to improve biomass production in crops? *Curr Opin Plant Biol.* 12(2):157-64.
- Guo, F., Liu, C., Xia, H., Bi, Y., Zhao, C., Zhao, S., Hou, L., Li, F., Wang, X. (2013) Induced expression of AtLEC1 and AtLEC2 differentially promotes somatic embryogenesis in transgenic tobacco plants. *PLoS ONE* 8: e71714
- Gutierrez, L., Van Wuytswinkel, O., Castelain, M., Bellini, C. (2007) Combined networks regulating seed maturation. *Trends Plant Sci.* 12(7):294-300.
- Gutierrez, C. (2009) The *Arabidopsis* cell division cycle. *Arabidopsis Book.* 7:e0120.

- Gutzat, R., Borghi, L., Fütterer, J., Bischof, S., Laizet, Y., Hennig, L., Feil, R., Lunn, J., Gruissem, W. (2011) RETINOBLASTOMA-RELATED PROTEIN controls the transition to autotrophic plant development. *Development* 138(14):2977-86.
- Gutzat, R., Borghi, L., Gruissem, W. (2012) Emerging roles of RETINOBLASTOMA-RELATED proteins in evolution and plant development. *Trends Plant Sci.* 17(3):139-48.
- Haecker, A., Gross-Hardt, R., Geiges, B., Sarkar, A., Breuninger, H., Herrmann, M., Laux, T. (2004) Expression dynamics of WOX genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 131:657–68
- Haga, N., Kato, K., Murase, M., Araki, S., Kubo, M., Demura, T., Suzuki, K., Müller, I., Voss, U., Jürgens, G., Ito, M. (2007) R1R2R3-Myb proteins positively regulate cytokinesis through activation of KNOLLE transcription in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 134: 1101-10.
- Haga, N., Kobayashi, K., Suzuki, T., Maeo, K., Kubo, M., Ohtani, M., Mitsuda, N., Demura, T., Nakamura, K., Jürgens, G., Ito, M. (2011) Mutations in MYB3R1 and MYB3R4 cause pleiotropic developmental defects and preferential downregulation of multiple G2/M-specific genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 157: 706–717.
- Harada, J.J. (1997) Seed maturation and the control of germination. *Cellular and Molecular Biology of Seed Development, Advances in Cellular and Molecular Biology of Plants*, eds Larkins BA, Vasil IK (Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands), Vol 4, pp 545–592.
- Harada, J.J. (2001) Role of *Arabidopsis* LEAFY COTYLEDON genes in seed development. *J of Plant Physiol.* 158, 405-409.
- Harashima, H., Sugimoto, K. (2016) Integration of developmental and environmental signals into cell proliferation and differentiation through RETINOBLASTOMA-RELATED 1. *Curr Opin Plant Biol.* 29:95-103.
- Hartwell, L.H. (1991) Twenty-five years of cell cycle genetics. *Genetics* 129, 975–980.
- Helariutta, Y., Fukaki, H., Wysocka-Diller, J., Nakajima, K., Jung, J., Sena, G., Hauser, M.T., Benfey, P.N. (2000) The SHORTROOT gene controls radial patterning of the *Arabidopsis* root through radial signaling. *Cell* 101:555–67.



Henriques, R., Magyar, Z., Monardes, A., Khan, S., Zalejski, C., Orellana, J., Szabados, L., de la Torre, C., Koncz, C., Bögre, L. (2010) Arabidopsis S6 kinase mutants display chromosome instability and altered RBR1-E2F pathway activity. *EMBO J.* 29(17):2979-93.

Henriques, R., Magyar, Z., Bögre, L. (2013) S6K1 and E2FB are in mutually antagonistic regulatory links controlling cell growth and proliferation in Arabidopsis. *Plant Signal Behav.* 8(6):e24367.

Heyman, J., Van den Daele, H., De Wit, K., Boudolf, V., Berckmans, B., Verkest, A., Alvim Kamei, C.L., De Jaeger, G., Koncz, C., and De Veylder, L. (2011) Arabidopsis ULTRAVIOLET-B-INSENSITIVE4 maintains cell division activity by temporal inhibition of the anaphase-promoting complex/cyclosome. *PlantCell.* 23, 4394-4410.

Holdsworth, M., Kurup, S., Mckibbin, R. (1999) Molecular and genetic mechanisms regulating the transition from embryo development to germination. *Trends Plant Sci.* 4(7):275-280.

Holdsworth, M.J., Bentsink, L., Soppe, W.J. (2008) Molecular networks regulating Arabidopsis seed maturation, after-ripening, dormancy and germination. *New Phytol.* 179(1):33-54.

Horvath, B.M., Kourova, H., Nagy, S., Nemeth, E., Magyar, Z., Papdi, C., Ahmad, Z., Sanchez-Perez, G.F., Perilli, S., Blilou, I., Pettkó-Szandtner, A., Darula, Z., Meszaros, T., Binarova, P., Bogre, L., Scheres, B. (2017) Arabidopsis RETINOBLASTOMA RELATED directly regulates DNA damage responses through functions beyond cell cycle control. *EMBO J.* 36(9):1261-1278.

Hou, A., Liu, K., Catawatcharakul, N., Tang, X., Nguyen, V., Keller, W.A., Tsang, E.W., Cui, Y. (2005) Two naturally occurring deletion mutants of 12S seedstorage proteins in Arabidopsis thaliana. *Planta* 222(3):512-20.

Hu, Y.L., Zhou, L.M., Huang, M.K., He, X.M., Yang, Y.H., Liu, X., Li, Y.G., Hou, X.L. (2018) Gibberellins play an essential role in late embryogenesis of Arabidopsis. *Nat Plants.* 4: 289–298.

Inzé, D., De Veylder, L. (2006) Cell cycle regulation in plant development. *Annu Rev Genet.* 40:77-105.

Jeong, S., Palmer, T.M., Lukowitz, W. (2011) The RWP-RK factor GROUNDED promotes embryonic polarity by facilitating YODA MAP kinase signaling. *Curr. Biol.* 21:1268–76.

- Jia, H., Suzuki, M., McCarty, D.R. (2014) Regulation of the seed to seedling developmental phase transition by the LAFL and VAL transcription factor networks. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* 3: 135–145.
- Junker, A., Monke, G., Rutten, T., Keilwagen, J., Seifert, M., Thi, T.M., Renou, J.P., Balzergue, S., Viehover, P., Hahnel, U., Ludwig-Muller, J., Altschmied, L., Conrad, U., Weisshaar, B., Baumlein, H. (2012) Elongation-related functions of LEAFY COTYLEDON1 during the development of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 71: 427–442.
- Kobayashi, K., Suzuki, T., Iwata, E., Nakamichi, N., Suzuki, T., Chen, P., Ohtani, M., Ishida, T., Hosoya, H., Müller, S., Leviczky, T., Pettkó-Szandtner, A., Darula, Z., Iwamoto, A., Nomoto, M., Tada, Y., Higashiyama, T., Demura, T., Doonan, J.H., Hauser, M.T., Sugimoto, K., Umeda, M., Magyar, Z., Bögre, L., Ito, M. (2015) Transcriptional repression by MYB3R proteins regulates plant organ growth. *EMBO J.* 34(15):1992-2007.
- Koncz, C., Németh, K., Rédei, G.P., Schell, J.(1992) T-DNA insertional mutagenesis in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol.* 20:963–976.
- Kosugi, S., Ohashi, Y. (2002) Interaction of the *Arabidopsis* E2F and DP proteins confers their concomitant nuclear translocation and transactivation. *Plant Physiol.* 128(3):833-43.
- Kosugi, S., Ohashi, Y. (2003) Constitutive E2F expression in tobacco plants exhibits altered cell cycle control and morphological change in a cell type-specific manner. *Plant Physiol.* 132(4):2012-22.
- Kroj, T., Savino, G., Valon, C., Giraudat, J., Parcy, F. (2003) Regulation of storage protein gene expression in *Arabidopsis*. *Development* 130(24):6065-73.
- Landrieu, I., da Costa, M., De Veylder, L., Dewitte, F., Vandepoele, K., Hassan, S., Wieruszeski, J.M., Corellou, F., Faure, J.D., Van Montagu, M., Inzé, D., Lippens, G. (2004) A small CDC25 dual-specificity tyrosine-phosphatase isoform in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(36):13380-5.
- Lau, S., Slane, D., Herud, O., Kong, J., Jürgens, G. (2012) Early embryogenesis in flowering plants: setting up the basic body pattern. *Annu Rev Plant Biol.* 63:483-506.

- Lauber, M.H., Waizenegger, I., Steinmann, T., Schwarz, H., Mayer, U., Hwang, I., Lukowitz, W., Jürgens, G. (1997) The Arabidopsis KNOLLE protein is a cytokinesis-specific syntaxin. *J Cell Biol.* 139(6):1485-93.
- Laux, T., Mayer, K.F.X., Berger, J., Jürgens, G. (1996) The WUSCHEL gene is required for shoot and floral meristem integrity in Arabidopsis. *Development* 122:87–96.
- Le, B.H., Cheng, C., Bui, A.Q., Wagmaister, J.A., Henry, K.F., Pelletier, J., Kwong, L., Belmonte, M., Kirkbride, R., Horvath, S., Drews, G.N., Fischer, R.L., Okamuro, J.K., Harada, J.J., Goldberg, R.B. (2010) Global analysis of gene activity during Arabidopsis seed development and identification of seed-specific transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107(18):8063-70.
- Ledwon, A., Gaj, M.D. (2011) LEAFY COTYLEDON1, FUSCA3 expression and auxin treatment in relation to somatic embryogenesis induction in Arabidopsis. *Plant Growth Regul.* 65: 157–167.
- Lee, H., Ohno, K., Voskoboynik, Y., Ragusano, L., Martinez, A., Dimova, D.K. (2010) Drosophila RB proteins repress differentiation-specific genes via two different mechanisms. *Mol Cell Biol.* 30(10):2563-77.
- Li, H.C., Chuang, K., Henderson, J.T., Rider, S.D., Bai, Y., Zhang, H., Fountain, M., Gerber, J., Ogas, J. (2005) PICKLE acts during germination to repress expression of embryonic traits. *Plant J.* 44: 1010–1022.
- Li, Y., Beisson, F., Pollard, M., Ohlrogge, J. (2006) Oil content of Arabidopsis seeds: the influence of seed anatomy, light and plant-to-plant variation. *Phytochemistry.* 67(9):904-15.
- Litovchick, L., Sadasivam, S., Florens, L., Zhu, X., Swanson, S.K., Velmurugan, S., Chen, R., Washburn, M.P., Liu, X.S., DeCaprio, J.A. (2007) Evolutionarily conserved multisubunit RBL2/p130 and E2F4 protein complex represses human cell cycle-dependent genes in quiescence. *Mol Cell.* 26(4):539-51.
- Liu, J., Hua, W., Zhan, G., Wei, F., Wang, X., Liu, G., Wang, H. (2010) Increasing seed mass and oil content in transgenic Arabidopsis by the overexpression of wr1-like gene from Brassica napus. *Plant Physiol. Biochem.* 48(1):9.

- López-Juez, E., Dillon, E., Magyar, Z., Khan, S., Hazeldine, S., de Jager, S.M., Murray, J.A., Beemster, G.T., Bögre, L., Shanahan, H. (2008) Distinct light-initiated gene expression and cell cycle programs in the shoot apex and cotyledons of *Arabidopsis*. *PlantCell*. 20(4):947-68.
- Lotan, T., Ohto, M., Yee, K.M., West, M.A., Lo, R., Kwong, R.W., Yamagishi, K., Fischer, R.L., Goldberg, R.B., Harada, J.J. (1988) *Arabidopsis* LEAFY COTYLEDON1 is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. *Cell* 93(7):1195-205.
- Lowe, K., Hoerster, G., Sun, X., Rasco-Gaunt, S., Lazerri, P., Ellis, S., Abbitt, S., Glassman, K., Gordon-Kamm, B. (2003) Maize LEC1 improves transformation in both maize and wheat. In: Vasil IK, ed. *Plant Biotechnology 2002 and Beyond: Proceedings of the 10th IAPTC&B Congress*. June 23–28, 2002 Orlando, Florida, USA. Springer Netherlands, Dordrecht. pp. 283–284.
- Luerssen, H., Kirik, V., Herrmann, P., Miséra, S. (1998) FUSCA3 encodes a protein with a conserved VP1/AB13-like B3 domain which is of functional importance for the regulation of seed maturation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 15(6):755-64.
- Luo, M., Dennis, E.S., Berger, F., Peacock, W.J., Chaudhury, A. (2005) MINISEED3 (MINI3), a WRKY family gene, and HAIKU2 (IKU2), a leucine-rich repeat (LRR) KINASE gene, are regulators of seed size in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:17531-6.
- Ma, W., Kong, Q., Arondel, V., Kilaru, A., Bates, P.D., Thrower, N.A., Benning, C., Ohlrogge, J.B. (2013) Wrinkled1, a ubiquitous regulator in oil accumulating tissues from *Arabidopsis* embryos to oil palm mesocarp. *PLoS One*8(7):e68887.
- Maeo, K., Tokuda, T., Ayame, A., Mitsui, N., Kawai, T., Tsukagoshi, H., Ishiguro, S., Nakamura, K. (2009) An AP2-type transcription factor, WRINKLED1, of *Arabidopsis thaliana* binds to the AW-box sequence conserved among proximal upstream regions of genes involved in fatty acid synthesis. *Plant J.* 60(3):476-87.
- Magyar, Z., Atanassova, A., De Veylder, L., Rombauts, S., Inzé, D. (2000) Characterization of two distinct DP-related genes from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 486(1):79-87.
- Magyar, Z., De Veylder, L., Atanassova, A., Bakó, L., Inzé, D., Bögre, L. (2005) The role of the *Arabidopsis* E2FB transcription factor in regulating auxin-dependent cell division. *Plant Cell* 17(9):2527-41.

- Magyar, Z. (2008) Keeping the Balance Between Proliferation and Differentiation by the E2F Transcriptional Regulatory Network is Central to Plant Growth and Development. In: Bogre L, Beemster GT (eds) In plant growth signaling. Springer, Berlin/Heidelberg.
- Magyar, Z., Horváth, B., Khan, S., Mohammed, B., Henriques, R., De Veylder, L., Bakó, L., Scheres, B., Bögre, L. (2012) Arabidopsis E2FA stimulates proliferation and endocycle separately through RBR-bound and RBR-free complexes. *EMBO J.* 31(6):1480-93.
- Magyar, Z., Ito, M., Binarová, P., Mohamed, B., Bogre, L. (2012) Cell Cycle modules in plants for entry into proliferation and for mitosis. *Plant Genome Diversity*. (J. Greilhuber et al. (eds.), Springer-Verlag Wien) Volume 2 pp 77-97.
- Magyar, Z., Bögre, L., Ito, M. (2016) DREAMs make plant cells to cycle or to become quiescent. *Curr Opin Plant Biol.* 34:100-106.
- Mariconti, L., Pellegrini, B., Cantoni, R., Stevens, R., Bergounioux, C., Cella, R., Albani, D. (2002) The E2F Family of Transcription Factors From Arabidopsis Thaliana. Novel and Conserved Components of the retinoblastoma/E2F Pathway in Plants. *J Biol Chem.* 277(12):9911-9.
- Masaki, T., Mitsui, N., Tsukagoshi, H., Nishii, T., Morikami, A., Nakamura, K. (2005) ACTIVATOR of Spmin::LUC1/WRINKLED1 of Arabidopsis thaliana transactivates sugar-inducible promoters. *Plant Cell Physiol.* 46(4):547-56.
- Mayer, K.F.X., Schoof, H., Haecker, A., Lenhard, M., Jürgens, G., Laux, T. (1998) Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in the Arabidopsis shoot meristem. *Cell* 95:805–15.
- McCarty, D.R. (1995) Genetic control and integration of maturation and germination pathways in seed development. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 46:71-93.
- Meinke, D.W. (1992) A Homoeotic Mutant of Arabidopsis thaliana with Leafy Cotyledons. *Science* 258(5088):1647-50.
- Meinke, D.W., Franzmann, L.H., Nickle, T.C., Yeung, E.C. (1994) Leafy cotyledon mutants of Arabidopsis. *Plant Cell* 6: 1049–1064.

- Menand, B., Desnos, T., Nussaume, L., Berger, F., Bouchez, D., Meyer, C., Robaglia, C. (2002) Expression and disruption of the Arabidopsis TOR (target of rapamycin) gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Apr 30;99(9):6422-7.
- Mendes, A., Kelly, A.A., van Erp, H., Shaw, E., Powers, S.J., Kurup, S., Eastmond, P.J. (2013) bZIP67 regulates the omega-3 fatty acid content of Arabidopsis seed oil by activating fatty acid desaturase3. *Plant Cell* 25: 3104–3116.
- Menges, M., Hennig, L., Gruissem, W., Murray, J.A. (2003) Genome-wide gene expression in an Arabidopsis cell suspension. *Plant Mol Biol*. 53(4):423-42.
- Meyerowitz, E.M. (1992) Introduction to the Arabidopsis genome. In *Methods in Arabidopsis Research*, eds. C. Koncz, N-H. Chua and J.Schell, World Scientific, Singapore, pp. 100-118.
- Morgan, D.O. (2007) *The Cell Cycle: Principles of Control*. Oxford University Press.
- Mönke, G., Altschmied, L., Tewes, A., Reidt, W., Mock, H.P., Bäumlein, H., Conrad, U. (2004) Seed-specific transcription factors ABI3 and FUS3: molecular interaction with DNA. *Planta* 219(1):158-66.
- Murphy, M., Stinnakre, M-G., Senamaud-Beaufort, C., Winston, N.J., Sweeney, C., Kubelka, M., Carrington, M., Bréchet, C., Sobczak-Thépot, J. (1997) Delayed early embryonic lethality following disruption of the murine cyclin A2 gene. *Nature Genetics* 15:83–86.
- Nakagami, H., Kawamura, K., Sugisaka, K., Sekine, M., Shinmyo, A. (2002) Phosphorylation of retinoblastoma-related protein by the cyclin D/cyclin-dependent kinase complex is activated at the G1/S-phase transition in tobacco. *Plant Cell* 14(8):1847-57.
- Nakajima, K., Sena, G., Nawy, T., Benfey, P.N. (2001) Intercellular movement of the putative transcription factor SHR in root patterning. *Nature* 413:307–11.
- Nambara, E., Hayama, R., Tsuchiya, Y., Nishimura, M., Kawaide, H., Kamiya, Y., Naito, S. (2000) The role of ABI3 and FUS3 loci in Arabidopsis thaliana on phase transition from late embryo development to germination. *Dev Biol*. 220(2):412-23.
- Nambara, E., Marion-Poll, A. (2003) ABA action and interactions in seeds. *Trends Plant Sci*. 8(5):213-7.

- Nic-Can, G.I., Lopez-Torres, A., Barredo-Pool, F., Wrobel, K., Loyola-Vargas, V.M., Rojas-Herrera, R., De-la-Pena, C. (2013) New insights into somatic embryogenesis: Leafy cotyledon1, baby boom1 and WUSCHEL-related homeobox4 are epigenetically regulated in *Coffea canephora*. PLoS ONE 8: e72160.
- Nowack, M.K., Harashima, H., Dissmeyer, N., Zhao, X., Bouyer, D., Weimer, A.K., De Winter, F., Yang, F., Schnittger, A. (2012) Genetic framework of cyclin-dependent kinase function in *Arabidopsis*. Dev Cell. 22(5):1030-40.
- Ogas, J., Kaufmann, S., Henderson, J., Somerville, C. (1999) PICKLE is a CHD3 chromatin-remodeling factor that regulates the transition from embryonic to vegetative development in *Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci U S A. 96(24):13839-44.
- Ohto, M.A., Fischer, R.L., Goldberg, R.B., Nakamura, K., Harada, J.J. (2005) Control of seed mass by APETALA2. Proc Natl Acad Sci U S A. 102(8):3123-8.
- Olsen, O.A. (2001) ENDOSPERM DEVELOPMENT: Cellularization and Cell Fate Specification. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol. 52:233-267.
- Orlowska, A., Igielski, R., Lagowska, K., Kepczynska, E. (2017) Identification of LEC1, L1L and Polycomb Repressive Complex 2 genes and their expression during the induction phase of *Medicago truncatula* Gaertn. somatic embryogenesis. Plant Cell Tiss Organ Cult. 129: 119–132.
- Őszi, E., Papdi, C., Mohammed, B., Pettkó-Szandtner, A., Vaskó-Leviczky, T., Molnár, E., Ampudia, C.G., Khan, S., Lopez-Juez, E., Horváth, B., Bögre, L., Magyar, Z. (2020) E2FB interacts with RETINOBLASTOMA RELATED and regulates cell proliferation during leaf development. Plant Physiol. 182(1):518-533.
- Papworth, C., Bauer, J.C., Braman, J., Wright, D.A. (1996) QuickChange site-directed mutagenesis. Strategies. 9,3-4.
- Parcy, F., Valon, C., Raynal, M., Gaubier-Comella, P., Delseny, M., Giraudat, J. (1994) Regulation of gene expression programs during *Arabidopsis* seed development: roles of the ABI3 locus and of endogenous abscisic acid. Plant Cell 6(11):1567-82.
- Park, J.A., Ahn, J.W., Kim, Y.K., Kim, S.J., Kim, J.K., Kim, W.T., Pai, H.S. (2005) Retinoblastoma protein regulates cell proliferation, differentiation, and endoreduplication in plants. Plant J. 42(2):153-63.

- Pelletier, J.M., Kwong, R.W., Park, S., Le, B.H., Baden, R., Cagliari, A., Hashimoto, M., Munoz, M.D., Fischer, R.L., Goldberg, R.B., Harada, J.J. (2017) LEC1 sequentially regulates the transcription of genes involved in diverse developmental processes during seed development. *Proc Natl Acad Sci USA*. 114: E6710–E6719.
- Peters, J.M. (1998). SCF and APC: the Yin and Yang of cell cycle regulated proteolysis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 759–768.
- Poulsen, G.B. (1996) Genetic transformation of Brassica. *Plant Breed.* 115, 209-225.
- Pouvreau, B., Baud, S., Vernoud, V., Morin, V., Py, C., Gendrot, G., Pichon, J.P., Rouster, J., Paul, W., Rogowsky, P.M. (2011) Duplicate maize Wrinkled1 transcription factors activate target genes involved in seed oil biosynthesis. *Plant Physiol.* 156(2):674-86.
- Puddephat, I.J., Riggs, T.J., Fenning, T.M. (1996) Transformation of Brassica oleracea L.: a critical review. *Molecular Breeding* pp 185–210.
- Raz, V., Bergervoet, J.H., Koornneef, M. (2001) Sequential steps for developmental arrest in Arabidopsis seeds. *Development.* 128(2):243-52.
- Reed, S.I. (2003). Ratchets and clocks: the cell cycle, ubiquitylation and protein turnover. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 855–864.
- Rubin S.M., Gall, A.L., Zheng, N., Pavletich, N.P. (2005) Structure of the Rb C-terminal domain bound to E2F1-DP1: a mechanism for phosphorylation-induced E2F release. *Cell* 123(6):1093-106.
- Sadasivam, S., Duan, S., DeCaprio, J.A. (2012) The MuvB complex sequentially recruits B-Myb and FoxM1 to promote mitotic gene expression. *Genes Dev.* 26(5):474-89.
- Sadasivam, S., DeCaprio, J.A. (2013) The DREAM complex: master coordinator of cell cycle-dependent gene expression. *NatRev Cancer.* 13(8):585-95.
- Santamaría, D., Barrière, C., Cerqueira, A., Hunt, S., Tardy, C., Newton, K., Cáceres, J.F., Dubus, P., Malumbres, M., Barbacid, M. (2007) Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle. *Nature* 448(7155):811-5.
- Scheres, B., Xu, J. (2006) Polar auxin transport and patterning: grow with the flow. *Genes Dev.* 20(8):922-6.



Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W. (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *NatMethods* 9(7):671-5.

Sherr, C.J., James M Roberts, J.M. (2004) Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.* 18(22):2699-711.

Shimada, T., Fuji, K., Tamura, K., Kondo, M., Nishimura, M., Hara-Nishimura, I. (2003) Vacuolar sorting receptor for seed storage proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(26):16095-100.

Simon, T. (1994) A magyarországi edényes flóra határozója (Harasztok-Virágos növények).

Sozzani, R., Maggio, C., Varotto, S., Canova, S., Bergounioux, C., Albani, D., Cella, R. (2006) Interplay between *Arabidopsis* activating factors E2Fb and E2Fa in cell cycle progression and development. *Plant Physiol.* 140(4):1355-66.

Sozzani, R., Maggio, C., Giordo, R., Umana, E., Ascencio-Ibañez, J.T., Hanley-Bowdoin, L., Bergounioux, C., Cella, R., Albani, D. (2010) The E2FD/DEL2 factor is a component of a regulatory network controlling cell proliferation and development in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol.* 72(4-5):381-95.

Stone, S.L., Braybrook, S.A., Paula, S.L., Kwong, L.W., Meuser, J., Pelletier, J., Hsieh, T.F., Fischer, R.L., Goldberg, R.B., Harada, J.J. (2008) *Arabidopsis* LEAFY COTYLEDON2 induces maturation traits and auxin activity: Implications for somatic embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(8):3151-6.

Stone, S.L., Kwong, L.W., Yee, K.M., Pelletier, J., Lepiniec, L., Fischer, R.L., Goldberg, R.B., Harada, J.J. (2001) LEAFY COTYLEDON2 encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(20):11806-11.

Sun, X., Shantharaj, D., Kang, X., Ni, M. (2010) Transcriptional and Hormonal Signaling Control of *Arabidopsis* Seed Development. *Curr Opin Plant Biol.* 13(5):611-20.

Suzuki, M., Wang, H.H., McCarty, D.R. (2007) Repression of the LEAFY COTYLEDON 1/B3 regulatory network in plant embryo development by VP1/ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3-LIKE B3 genes. *Plant Physiol.* 143(2):902-11.

- Takada, S., Jürgens, G. (2007) Transcriptional regulation of epidermal cell fate in the *Arabidopsis* embryo. *Development* 134(6):1141-50.
- Tanaka, M., Kikuchi, A., Kamada, H. (2008) The *Arabidopsis* histone deacetylases HDA6 and HDA19 contribute to the repression of embryonic properties after germination. *Plant Physiol.* 146(1):149-61.
- Tang, L.P., Zhou, C., Wang, S.S., Yuan, J., Zhang, X.S., Su, Y.H. (2017) FUSCA3 interacting with LEAFY COTYLEDON2 controls lateral root formation through regulating YUCCA4 gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.* 213(4):1740-1754.
- Taylor-Teeples, M., Lin, L., de Lucas, M., Turco, G., Toal, T.W., Gaudinier, A., Young, N.F., Trabucco, G.M., Veling, M.T., Lamothe, R., Handakumbura, P.P., Xiong, G., Wang, C., Corwin, J., Tsoukalas, A., Zhang, L., Ware, D., Pauly, M., Kliebenstein, D.J., Dehesh, K., Tagkopoulos, I., Breton, G., Pruneda-Paz J.L., Ahnert, S.E., Kay, S.A., Hazen, S.P., Brady, S.M. (2015) An *Arabidopsis* Gene Regulatory Network for Secondary Cell Wall Synthesis. *Nature* 517(7536): 571–575.
- To, A., Valon, C., Savino, G., Guilleminot, J., Devic, M., Giraudat, J., Parcy, F. (2006) A network of local and redundant gene regulation governs *Arabidopsis* seed maturation. *Plant Cell* 18(7):1642-51.
- Tsuchiya, Y., Nambara, E., Naito, S., McCourt, P. (2004) The FUS3 transcription factor functions through the epidermal regulator TTG1 during embryogenesis in *Arabidopsis*. *Plant J.* 37(1):73-81.
- Ueda, M., Zhang, Z., Laux, T. (2011) Transcriptional activation of *Arabidopsis* axis patterning genes WOX8/9 links zygote polarity to embryo development. *Dev. Cell* 20:264–70.
- Van Daele, I., Gonzalez, N., Vercauteren, I., de Smet, L., Inzé, D., Roldán-Ruiz, I., Vuylsteke, M. (2012) A comparative study of seed yield parameters in *Arabidopsis thaliana* mutants and transgenics. *Plant Biotechnol J.* 10(4):488-500.
- van den Heuvel, S., Dyson, N.J. (2008) Conserved functions of the pRB and E2F families. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9(9):713-24.

- Vandepoele, K., Raes, J., De Veylder, L., Rouzé, P., Rombauts, S., Inzé, D. (2002) Genome-wide analysis of core cell cycle genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 14(4):903-16.
- Vandepoele, K., Vlieghe, K., Florquin, K., Hennig, L., Beemster, G.T., Grissem, W., Van de Peer, Y., Inzé, D., De Veylder, L. (2005) Genome-wide identification of potential plant E2F target genes. *Plant Physiol*. 139(1):316-28.
- Vandepoele, K., Quimbaya, M., Casneuf, T., De Veylder, L., Van de Peer, Y. (2009) Unraveling transcriptional control in *Arabidopsis* using cis-regulatory elements and coexpression networks. *Plant Physiol*. 150(2):535-46.
- Vicente-Carbajosa, J., Carbonero, P. (2005) Seed maturation: developing an intrusive phase to accomplish a quiescent state. *Int J Dev Biol*. 49(5-6):645-51.
- Vlieghe, K., Vuylsteke, M., Florquin, K., Rombauts, S., Maes, S., Ormenese, S., Van Hummelen, P., Van de Peer, Y., Inze, D., De Veylder, L. (2003) Microarray analysis of E2Fa-DPa-overexpressing plants uncovers a cross-talking genetic network between DNA replication and nitrogen assimilation. *J Cell Sci*. 116(Pt 20):4249-59.
- Vlieghe, K., Boudolf, V., Beemster, G.T., Maes, S., Magyar, Z., Atanassova, A., de Almeida Engler, J., De Groodt, R., Inze, D., De Veylder, L. (2005) The DP-E2F-like gene DEL1 controls the endocycle in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Biol*. 15:59-63.
- Wang, A., Garcia, D., Zhang, H., Feng, K., Chaudhury, A., Berger, F., Peacock, W.J., Dennis, E.S., Luo, M. (2010) The VQ motif protein IKU1 regulates endosperm growth and seed size in *Arabidopsis*. *Plant J*. 63:670-9.
- Wang, S., Gu, Y., Zebell, S.G., Anderson, L.K., Wang, W., Mohan, R., Dong, X. (2014) A non canonical role for the CKI-RB-E2F cell-cycle signaling pathway in plant effect or-triggered immunity. *Cell Host Microbe*. 16(6):787-94.
- Wang, X., Wang, H., Wang, J., Sun, R., Wu, J., Liu, S., Bai, Y., Mun, J-H., Bancroft, I., Cheng, F., Huang, S., Li, X., Hua, W., Wang, J., Wang, X., Freeling, M., Pires, J.C., Paterson, A.H., Chalhoub, B., Wang, B., Hayward, A., Sharpe, A.G., Park, B-S., Weisshaar, B., Binghang Liu, Li, B., Liu, B., Tong, C., Song, C., Duran, C., Peng, C., Geng, C., Koh, C., Lin, C., Edwards, D., Mu, D., Shen, D., Soumpourou, E., Li, F., Fraser, F., Conant, G., Lassalle, G., King, G.J., Bonnema, G., Tang, H., Wang, H., Belcram, H., Zhou, H., Hirakawa, H., Abe, H., Guo, H.,

Wang, H., Jin, H., Parkin, I.A.P. Batley, J., Kim, J-S., Just, J., Li, J., Xu, J., Deng, J., Kim, J.A., Li, J., Yu, J., Meng, J., Wang, J., Min, J., Poulain, J., Wang, J., Hatakeyama, K., Wu, K., Wang, L., Fang, L., Trick, M., Links, M.G., Zhao, M., Jin, M., Ramchiary, N., Drou, N., Berkman, P.J., Cai, Q., Huang, Q., Li, R., Tabata, R., Cheng, S., Zhang, S., Zhang, S., Huang, S., Sato, S., Sun, S., Kwon, S-J., Choi, S-R., Lee, T-H., Fan, W., Zhao, X., Tan, X., Xu, X., Wang, Y., Qiu, Y., Yin, Y., Li, Y., Du, Y., Liao, Y., Lim, Y., Narusaka, Y., Wang, Y., Wang, Z., Li, Z., Wang, Z., Xiong, Z., Zhang, Z., Brassica rapa Genome Sequencing Project Consortium (2011) The genome of the mesopolyploid crop species *Brassica rapa*. *Nat Genet.* 43(10):1035-9.

Weijers, D., Schlereth, A., Ehrismann, J.S., Schwank, G., Kientz, M., Jürgens, G. (2006) Auxin triggers transient local signaling for cell specification in *Arabidopsis* embryogenesis. *Dev Cell.* 10:265–70.

Wendrich, J.R. ,Weijers, D. (2013) The *Arabidopsis* Embryo as a Miniature Morphogenesis Model. *New Phytol.* 199(1):14-25.

West, M.A., Harada, J.J. (1993) Embryogenesis in Higher Plants: An Overview. *Plant Cell* 5, 1361±1369.

West, M., Yee, K.M., Danao, J., Zimmerman, J.L., Fischer, R.L., Goldberg, R.B., Harada, J.J. (1994) *LEAFY COTYLEDON1* is an essential regulator of late embryogenesis and cotyledon identity in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 6: 1731–1745.

White, C.N., Proebsting, W.M., Hedden, P., Rivin, C.J. (2000) Gibberellins and seed development in maize. I. Evidence that gibberellin/abscisic acid balance governs germination versus maturation pathways. *Plant Physiol.*122: 1081-1088.

Wildwater, M., Campilho,A., Perez-Perez, J.M., Heidstra, R., Blilou, I., Korthout, H., Chatterjee, J., Mariconti, L., Gruissem, W., Scheres, B. (2005) The *RETINOBLASTOMA-RELATED* gene regulates stem cell maintenance in *Arabidopsis* roots. *Cell* 123(7):1337-49.

Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G.V., Provart, N.J. (2007) An "Electronic Fluorescent Pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological datasets. *PLoS One* 2(8):e718.

Wobus, U., Weber, H. (1999). Seed maturation: genetic programmes and control signals. *Curr Opin Plant Biol.* 2(1):33-8.

Wysocka-Diller, J.W., Helariutta, Y., Fukaki, H., Malamy, J.E., Benfey, P.N. (2000) Molecular analysis of SCARECROW function reveals a radial patterning mechanism common to root and shoot. *Development* 127:595–603.

Yamamoto, A., Kagaya, Y., Toyoshima, R., Kagaya, M., Takeda, S., Hattori, T. (2009) Arabidopsis NF-YB subunits LEC1 and LEC1-LIKE activate transcription by interacting with seed-specific ABRE-binding factors. *Plant J.* 58: 843–856.

Yang, X., Zhang, X. (2010) Regulation of somatic embryogenesis in higher plants. *CRC Crit Rev Plant Sci.* 29: 36–57.

Yang, C., Bratzel, F., Hohmann, N., Koch, M., Turck, F., Calonje, M. (2013) VAL- and AtBMI1-mediated H2Aub initiate the switch from embryonic to postgerminative growth in Arabidopsis. *Curr Biol.* 23(14):1324-9.

Yao, X., Yang, H., Zhu, Y., Xue, J., Wang, T., Song, T., Yang, Z., Wang, S. (2018) The canonical E2Fs are required for germline development in Arabidopsis. *Front Plant Sci.* 9:638.

Zappia, M.P., Frolov, M.V. (2016) E2F function in muscle growth is necessary and sufficient for viability in *Drosophila*. *Nat Commun.* 7:10509.

Zhang, X., Clarenz, O., Cokus, S., Bernatavichute, Y.V., Pellegrini, M., Goodrich, J., Jacobsen, S.E. (2007) Whole-genome analysis of histone H3 lysine 27 trimethylation in Arabidopsis. *PLoS Biol.* 5(5):e129.

# PUBLIKÁCIÓS LISTA

MTMT azonosító: 10050899

A disszertáció alapjául szolgáló közlemények:

**Leviczky, T.,** Molnár, E., Papdi, C., Őszi, E., Horváth, G.V., Vizler, C., Nagy, V., Pauk, J., Bögre, L., Magyar, Z. (2019) **E2FA and E2FB transcription factors coordinate cell proliferation with seed maturation.** Development 146(22):dev179333.

Kobayashi, K., Suzuki, T., Iwata, E., Nakamichi, N., Suzuki, T., Chen, P., Ohtani, M., Ishida, T., Hosoya, H., Müller, S., **Leviczky, T.,** Pettkó-Szandtner, A., Darula, Z., Iwamoto, A., Nomoto, M., Tada, Y., Higashiyama, T., Demura, T., Doonan, J.H., Hauser, M.T., Sugimoto, K., Umeda, M., Magyar, Z., Bögre, L., Ito, M. (2015) **Transcriptional repression by MYB3R proteins regulates plant organ growth.** EMBO J. 34(15):1992-2007.

Egyéb közlemények:

Őszi, E., Papdi, C., Mohammed, B., Pettkó-Szandtner, A., **Leviczky, T.,** Molnár, E., Galvan-Ampudia, C., Khan, S., Juez, E.L., Horváth, B., Bögre, L., Magyar, Z. (2020) **E2FB Interacts with RETINOBLASTOMA RELATED and Regulates Cell Proliferation during Leaf Development.** Plant Physiol. 182(1):518-533.

Benyó, D., Horváth, E., Németh, E., **Leviczky, T.,** Takács, K., Lehotai, N., Feigl, G., Kolbert, Z., Ördög, A., Gallé, R., Csiszár, J., Szabados, L., Erdei, L., Gallé, Á. (2016) **Physiological and molecular responses to heavy metal stresses suggest different detoxification mechanism of Populus deltoides and P. x canadensis.** J Plant Physiol. 201:62-70.

Gallé, Á., Csiszár, J., Benyó, D., Laskay, G., **Leviczky, T.,** Erdei, L., Tari, I. (2013) **Isohydic and anisohydic strategies of wheat genotypes under osmotic stress: biosynthesis and function of ABA in stress responses.** J Plant Physiol. 170(16):1389-99.

# KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném megköszönni a lehetőséget a Szegedi Tudományegyetem Biológia Doktori Iskolának, hogy elvégezhettem a doktori tanulmányaimat, illetve csoportvezetőmnek Dr. Magyar Zoltánnak, hogy a Szegedi Biológiai Kutatóközpontban, a Növényi Morfogenezis Szabályozása Csoportban biztosította számomra a támogatást és a helyszínt a munkám elvégzéséhez.

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek Dr. Magyar Zoltánnak, hogy a csoportban eltöltött évek alatt és azután is ösztönzően és türelmesen kísért figyelemmel és segítette munkámat. Tudományos és szakmai tanácsai, segítsége a megfelelő irányba tereltek munkám során.

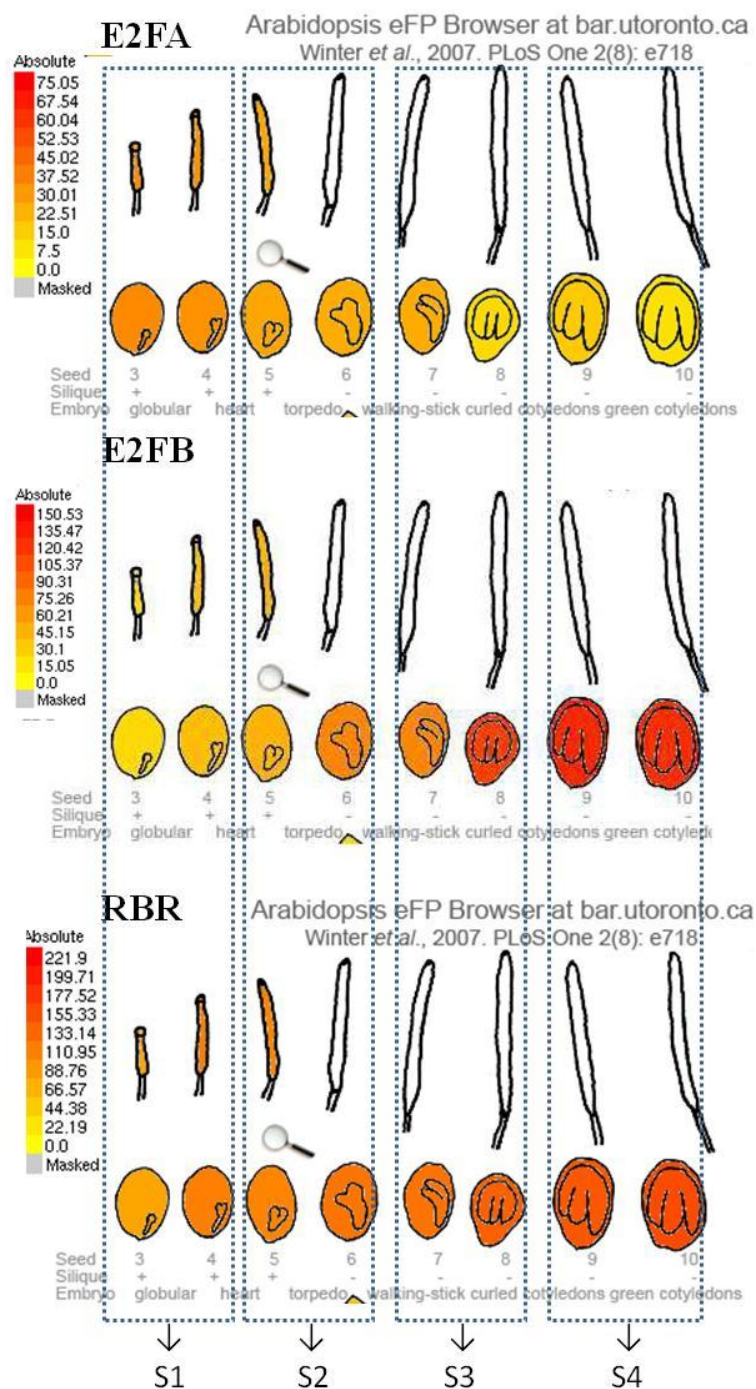
Hálásan köszönöm a csoport egykori és jelenlegi tagjainak, különösen Dr. Molnár Eszternek, Őszi Erikának, Pappné Deli Mártának és Dudásné Kovács Anitának a növények nevelésében, a laboratóriumi munkában és a szakmai kérdésekben nyújtott segítséget, valamint a vidám hangulatú munkanapokat.

Dr. Pettkó-Szandtner Aladárnak köszönettel tartozom a tömegspektrometriás eredményekért, Dr. Papdi Csabának pedig a kromatin-immunoprecipitációban nyújtott segítségéért.

Végül, de nem utolsósorban hálás vagyok családomnak, akik támogattak munkám során és megteremtették a dolgozat megírásához szükséges nyugodt családi légkört.

Munkánkat egy OTKA-program (OTKA-K-105816) és egy GINOP támogatás (GINOP-2.3.2-15-2016-00001) finanszírozta. A jelölt munkáját a Magyar Tudományos Akadémia fiatal kutatói ösztöndíjjal támogatta.

## FÜGGELÉK



**29. ábra: Az *E2FA* (At2g36010), az *E2FB* (At5g22220) és az *RBR* (At3g12280) gének mag specifikus expressziós mintázata.**

Az ábrák az Arabidopsis eFP-browser adattárából származnak (Winter és mtsai., 2007). A megadott értékek megfelelnek az Affymetrix jel értékeinek. S1 az osztódási fázist, S2 az átmeneti fázist, S3 az érési fázist, S4 pedig az érés utáni nyugalmi fázist jelöli a becő és a mag fejlődése során.



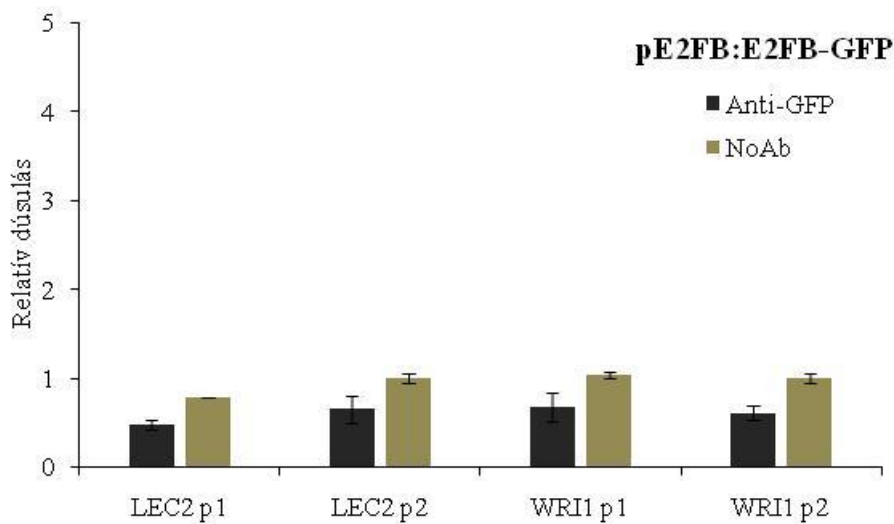
WT-Col



*e2fa-2/e2fb-1*

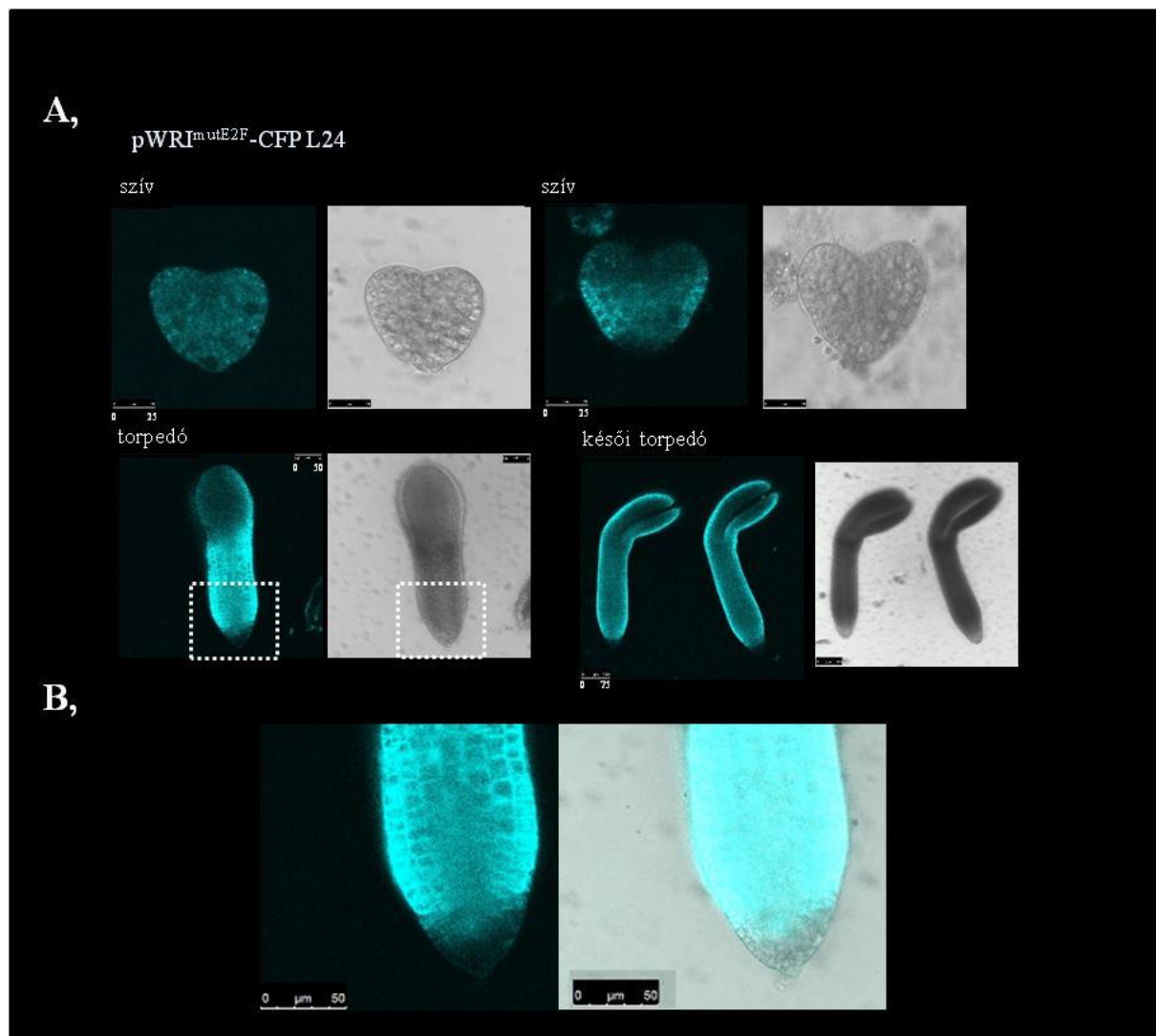
**30. ábra: Az *e2fa-2/e2fb-1* dupla mutáns részben steril.**

A képen vad típusú (WT-Col) és *e2fa-2/e2fb-1* dupla mutáns növények nyitott becőinek ez a szakasza látható. A mutáns esetében a magok egy része hiányzik. Méretskála: 0,5 cm.



**31. ábra: Az E2FB TF nem kötődik a *LEC2* és a *WRI1* gének promóter régiójához a fejlődő becőkben.**

A kromatin immunprecipitációt (ChIP) 6-10 napos zöld, fejlődő becőkből izolált kromatinon végeztük el. A minták a pgE2FB-GFP transzgenikus vonalról származtak, a kimutatáshoz nyúlban termeltetett anti-GFP ellenanyagot használtunk. A ChIP-et qRT-PCR analízis követte, melyhez a *LEC2* és *WRI1* promóterekre specifikus primereket használtunk. Az ábrán a reprezentatív kísérlet eredménye látható három biológiai ismétlésből származó értékekkel. A statisztikai analízishez a Mann-Whitney-próbát használtuk. NoAb: antitest nélküli kontroll minta (Dr. Papdi Csaba munkája alapján).



**32. ábra: Az E2F kötőhely mutáns WRI1 promóter az embriófejlődés során idő előtti aktivitást mutat.**

**A,** Éretlen magokból izolált fejlődő embriókról konfokális lézer scenning mikroszkóppal készült reprezentatív képek, amelyek egy független E2F kötőhely mutáns WRI1 promóterrel rendelkező vonalból származnak ( $p^{mutE2F}WRI1\text{-CFP L24}$ ). Erős CFP jelet detektáltunk a szív állapotú embriókban csakúgy, mint a másik E2F kötőhely mutáns WRI1 riporter vonalban ( $p^{mutE2F}WRI1\text{-CFP L22}$ , 17. ábra). A torpedó állapotú embrió embrionális gyökércsúcs régióját fehér szaggatott vonallal jelöltük az **A**, és kinagyítva láthatóak a **B**, ábrán. A CFP jel kék színnel látható. Az embriókról készült ábrák tartalmazzák a méretskálát.

## WRI1 promóter

ctctgaaacgaatatatgatactagggaaattaaaagctgattccaaaagataactcaagtttccgagcaacgaagtatgagaagaagaacaaaa  
gagtaccttttaattatcagcttaggtcattcaaaagaagaacgacgatcatacgagaggaactgaaaaggcgagagcagtgaaactgaagtgg  
aagagacgagacggttttggtccttttctactagaagtttagtcttggaatgtgcataatatttaatttcatttcaattttcaaatcaaaaaataa  
aacggataaacgaaactcttggtatcatattatgagcgttgataatttagagaatctctgttcttttagaaaattgtatgaacattttgttaaaaa  
taactatttttaaatgctaaacctcattgttttagtcctaaatgttaggaatcttagtattcatttttttctcttatgatatacacttccggttt  
agatttctaggacgttttaaatatttactgctaataaaaaatagttatttttaaaacaattaaataaaacaattgtatctctagagtaaa  
aaaagtttttaaaatgttggaatgttttatttggcaacccaacttaattcctgaaacgaatcacgagaattatttaacgtactacaaaagggtac  
atctaatttttctaaaaccgaatttagactatcgcttggtgttttggatgttgcatgtctatatattatgataattattctgtaagcattacaattaa  
atcgtttctgtttttactaaaggagtttgactgttttaaacgactgtaaacactcggtgtgtctgtttaaactcatgtggaagttaaagtataacag  
ttagaacatccaactttacatatgcttttgattagacattttctacgatattgttcggattgacacgtgctaatacatatctgatcattttccatttt  
acatatgttctaattaggcattttcgacgatacatttttagatcgataattgtgtaataatcatctgacatttttactttgtatgttctaattatgt  
atttatcagataaacatttagatcgacacatgcaaaacattcgacaatttggtaacactgaagacctaatttgttataatcacagctcagcgaagata  
cgttacaactaatttggagcgttttagaaaatataggcaaatagccaatatgctaataaaaagatttagaactttaataggtaatttaacacatt  
ttataacacacaagcatatatatttaaaagggaaaaaactagccaactttcatagaccatcattaccataataactcaattcaatcaaattttaatt  
tttggctactatttttcttttctaaacccaaacatcatatagtagtcttcaattttaaaatatagaattcaaatgttgaccagggaataaat  
agaatttcaaaaaacaaatttagatatattttacattccaacttttcccccaaaaaattagagaaaaaaatcagaaaaaaatcacaacacaa  
taaacgtacaaaaaagttaatgataaaaaaacgtaaaaaaaatacaaaaatacaaaagaaaaaagacagcgtggagagtaagctatttggtg  
gatggctgcaacagaaggccaagtgtttggtcttacaatttcatttttaactcttgtgttaatttaaccaatttagccctttctccttcagggtt  
tatttaacttgccctttctcgttttctccttttttcttaaacactctgcttctcctctctgagaaatcaaatcactcacactccaaaaaaa  
tctaaactttctcagagttaATG

E2F kötőhely: tttccccc

mutáció után: ttccaac

## LEC2 promóter

acatagaagactatagttggtgatattgactcttacaacattttgttaagaatttctccaaaacttatatgtcatcttacgaaaattgttaaaaca  
tcaaacagtaacattttgtaaaaagctaattacaacaacattttattaacagttaaaatataaatctcttaggtagccggattaaaactcttaattca  
attgtttacatatatattcgggagtagtccaaattttcttctaataataataaaagtaagtctattcttaggaacaagttttgagaaactgacat  
gtagatatagaactctaaatatattatcctaagaagctatggatttactaatttcacacctatccctatgtgaatccctaaactcaacgagagcatta  
ctaagacatgatcatagaagcatatatcatatttgaataaaattacataaaataattcaaaagattatagagtttagaaaagtattattttcttataa  
ggttttgaaatctctaaagaattcttgaaaaatagaaaaacaaaagtaaaagcttgataattctaactattgacccaaaaatataattaataggttctc  
aaaaacatttaggaacaaataatgcaaatacaaaaatcttatgggacaattatgtaattcttcaatttttaaaactgggaagactttgttggggtgc  
gaacggtgtctatcgacatgtcgatcgacattgatttactgtctgacaccaaattcgtttttccagcctttatttttctgtttggttccaaaatac  
tcaacgactacccttttggctacgataaataacgaaaagatttttaaaataacataatgaataacttaaaaaacaaatctatatcatataaataaacg  
aaaataatccatgatatatcaattataactcaacccaaagccaacgaacaaaaacatgaagcaagctacataactactaatgataagtctaaatc  
gtcttcgacatatctaaacaaacccaaatatataacttgaaaacaactctctcaccggacacaaatttctcaagcaagtgtaaaaaactctacg  
ataataacaaacagagtatatgtagctatgcaatccaaggagctttctcttataaaagtgtcacaaatggcggaacgggtgcgaatcttatgtagc  
tcaacgactacccttttggctacgataaataacgaaaagatttttaaaataacataatgaataacttaaaaaacaaatctatatcatataaataaacg  
ctttgttaattgtgaacaagttgttgttaatatcatgaatcattcagacagaaaaaaacagagaaaaatccccaaaaataagaaa  
atatatatgacgtacatcactatatttccctacctccttagtctcgttaggagttacgagtcgtgcgcctctctccagtatttgccataaataact  
gagtggtgatttttgtccatcaacccatgcctcttcaatatttttactaatccaccatttctctccattgttattgatatatattgttccacaaa  
tatacctatacaaaaacttatatttcaaaccttataacgaaacgaacgaagtttttcaaaatttcagagtttatggccgagaataaacatgagctcgg  
cggccgcggttttagaacaaaatttgtgtccatctcctcgccaaatgtaagtttctgatagagcataacattgggttgggacgaaaaaggaacaaat  
aagatgatagaaaattgctgggtaatttgaggtgttcttagggcagcaggttgaacatgttaccaaaccttaattcatggttagaaaatttgggtgacagtc  
aagcttatattatctttgataactatgtttctagttgtttcattatttagtatagaaaaaactttgtttttagagtggttctatgggttatgatttcg  
aaaagaaaaaaaattgtgagacacttaataaaattatttcgacaaaaaaagttagctgttataaaaaaatcagattttaattttatgtaagaacaaatt  
ccaatatccaatagttaaaaataaattatttgttccgattaatcgagttttgcaaaatatgcacaaaatctatcatcgtaccatttctaagactatat  
atttgggttatataatttatgcccgtgtgttctgattccaaataaatttttagcgcatagtaaattttctaaaaagcaaaatttctcaaaagtgtactaa  
tgacaattaattgagtttctacaaaataagaataactattgactcgattttcacaaaactagtagtctaataatcacattacttttaaaatataatg  
gaattatcttttcaattggtatgacgaataatttttacactaaagttatttttaataaaaataaccgtttattcaaaatatgtaaagacgacaaaaat  
atatattaaatggaaaaacgactaacttagttttgcaaaatataatggatttgccttttcaatgtttgaatacaaaaaaaatctataataagtt  
tatttatataaaataacccgttttttcagaatacgcacaaaacgacaaaaaataaattacaaagaaatttagtttatcaaaaaatagtaatggct  
attaatggtgtttactctaaatttaattattatgcatttatgctaattctttcctaaaggtacaaagattcggttttttcaatgtttgaactgcatatt  
aaggtatagatttggaccttaacagagtttaatatataagggaagagagcgaaggaactccaaaataaaataaagagccttctctctctctctctgaga  
aaaaacacatatagccaatgaccttctcgtggtctctctgtgccataaaagccattatatacattcaaacacaaatctggccacacatatcacatgta  
ctagtgtatgtatatgtcctaacctctgtattcatatctctctctgtctgagtggtgcgatgggtatccccataagctgcaaacattgaaccatc  
tgcaacattttgactcgttttcttttgtgttttccaacatctgtctcttctcactcgctctctcctaatcaatctcccaacgacctctctttt  
ttttgtttcttctcactcagatctctctcctctctctctctctctcctcctcgggaaaaATG

E2F kötőhely: cgggaaaa

mutáció után: ttggaaaa

## 33. ábra: E2F kötőhelyek és azok mutációi a WRI1 és a LEC2 promóterében.

A LEC2 és a WRI1 promóterek szekvenciái. Sárgával jelöltük a promótereken található E2F kötőhelyeket és feltüntetjük a Quick Change mutagenézis módszer segítségével megváltoztatott E2F kötőhelyek szekvenciáit. Kékkel jelöltük a transzlációs start helyet.

### E2FA fehérje

```
1 MSGVVRSSPG SSQPPPPPH HPPSSPVVPT STPVIPPIRR HLAFASTKPP FHPSDDYHRE
61 NPSSLSNNND RSFVHGCGVV DREEDAVVVR SPSRKRKATM DMVVAPSNG FTSSGFTNIP
121 SSPCQTPRKG GRVNIKSKAK GNKSTPQTPI STNAGSPITL TPSGSCRYDS SLGLLTKKFV
181 NLIKQAKDGM LDLNKAETL EVQKRRIYDI TNVLEGIDLI EKPFKNRIW KGVDACPGDE
241 DADVSVLQLQ AEIENLALEE QALDNQIRQT EERLRDLSEN EKNQKWLFVT EEDIKSLPGE
301 QNQTILIAVKA PHGTTLEVPD PDEAADHPQR RYRIILRSTM GPIDVYLVSE FEGKFEDTNG
361 SGAAPPACLP IASSSGSTGH HDIEALTVDN PETAIVSHDH PHPQPGDTS LNYLQEQVGG
421 MLKITPSDVE NDESDYWLLS NAEISMTDIW KTDGIDWDY GIADVSTPPP GMGEIAPTAV
481 DSTPR
```

e2fa-1: 300AS

e2fa-2: 346AS

### E2FB fehérje

```
1 MSEEVPQQFP SSKRQLHPSL SSMKPPLVAP GEYHRFDAE TRGGGAVADQ VVSDAIVIKS
61 TLKRKTDLVN QIVEVNEINT GVLQTPVSGK GKGAKKTSRS AKSNKSGTLA SGSNAGSPGN
121 NFAQAGTCRY DSSLGLLTKK FINLIKQAE GILDNLKAAD TLEVQKRRIY DITNVLEGIG
181 LIEKTLKNRI QWKGLDVSKP GETIESIANL QDEVQNLAEE EARLDDQIRE SQERLTSLSSE
241 DENNKRLLFV TENDIKNLPC FQNKTLIAVK APHGTTLEVP DPDEAGGYQR RYRIILRSTM
301 GPIDVYLVSQ FEESFEDIPQ ADEPSNVPDE PSNVPDVPSN LPSTSGLPEN HDVSMMPKKEE
361 STERNMETQE VDDTQRVYSD IESHDFVDGI MKIVPPDLDM GVDYWFRSEV GEVSITDMWP
421 DESGPDWNQM ITFDQDHAGP SDNKILEQPQ TPSSPTPEES TATRSPTGS
```

e2fb-1: 241AS

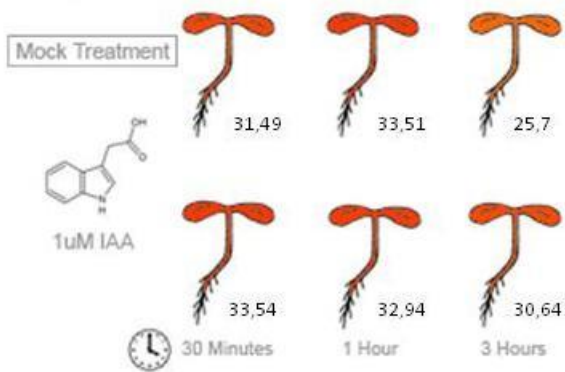
e2fb-2: 228AS

### 34. ábra: Az *e2f* mutánsok csonka E2F fehérjéinek szekvenciái.

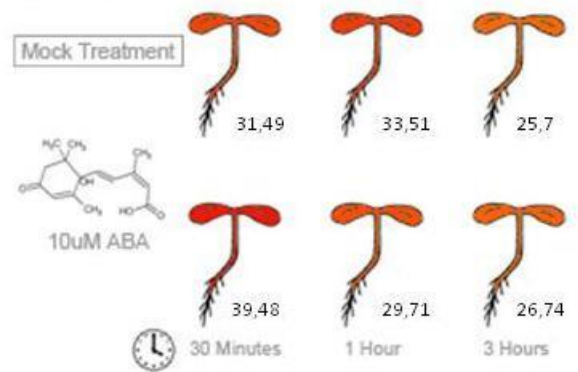
Az ábrán az E2FA és az E2FB fehérjék szekvenciái láthatók. Az E2FA esetében sárgával jelöltük az *e2fa-1* mutáns csonka E2FA fehérjéjét, pirossal az *e2fa-2* mutáns csonka E2FA fehérjéjét. Az E2FB esetében pirossal jelöltük az *e2fb-1* mutáns csonka E2FB fehérjéjét, sárgával az *e2fb-2* mutáns csonka E2FB fehérjéjét. AS: aminosav

# AtE2FA

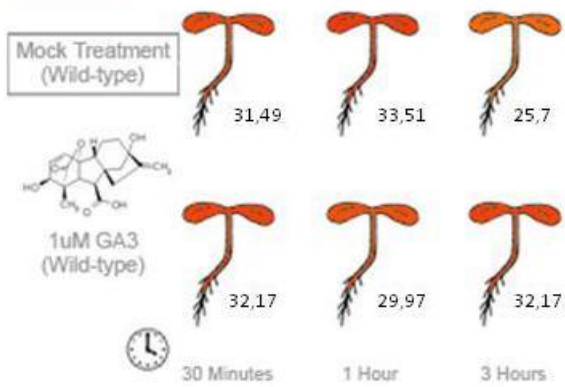
## IAA



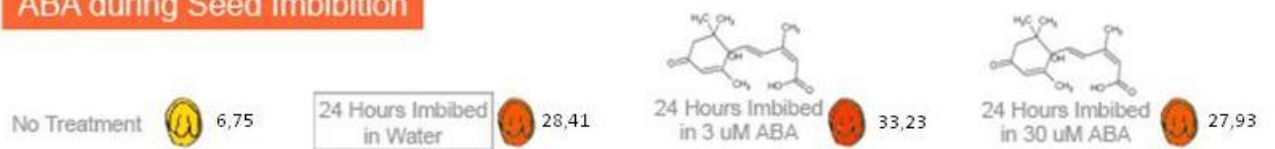
## ABA



## GA-3



## ABA during Seed Imbibition

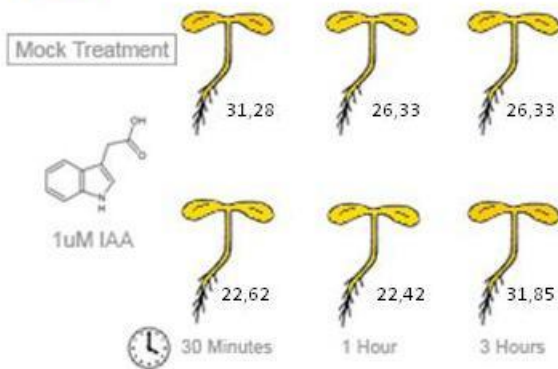


## Basic Hormones

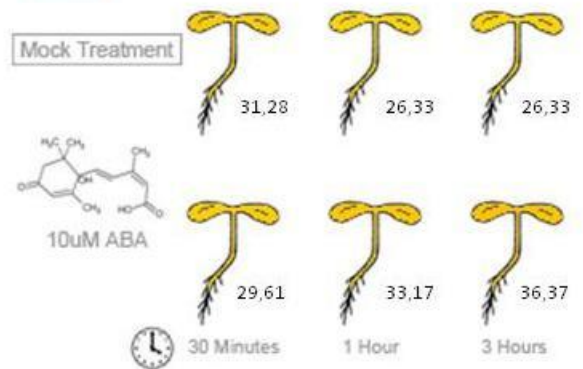


## AtE2FB

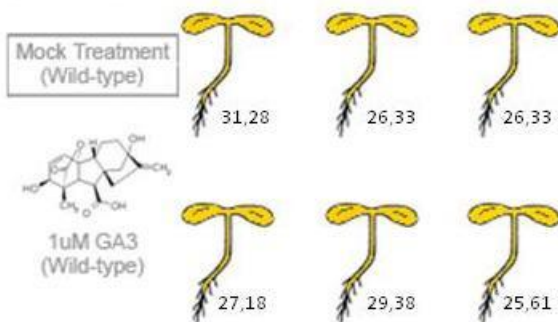
### IAA



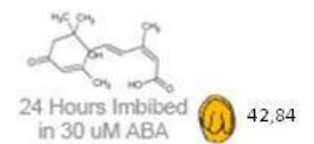
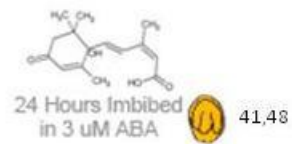
### ABA



### GA-3



### ABA during Seed Imbibition



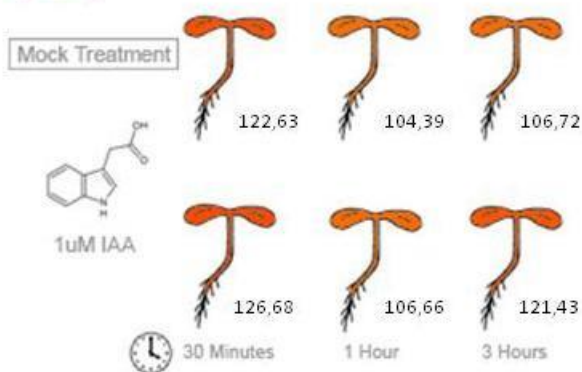
### Basic Hormones



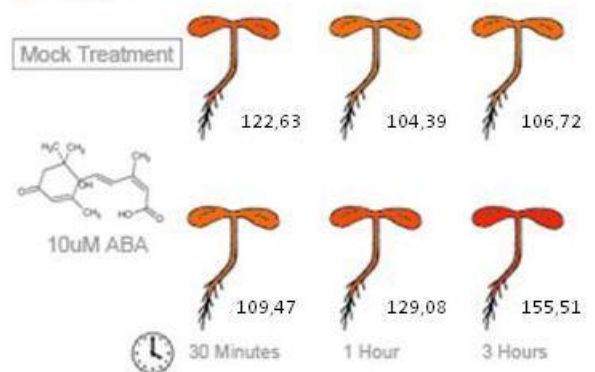


## AtRBR1

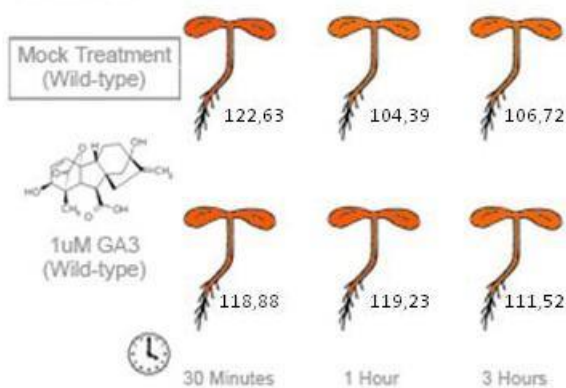
### IAA



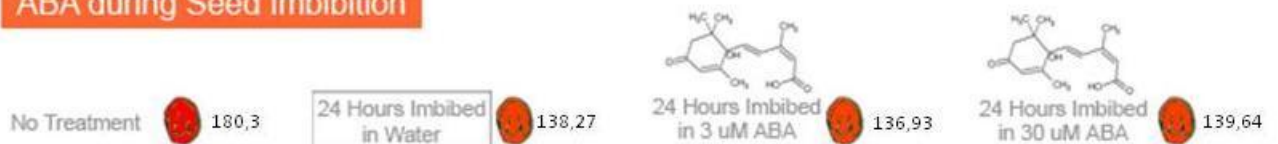
### ABA



### GA-3



### ABA during Seed Imbibition



### Basic Hormones



**35. ábra: Az embriófejlődést szabályzó hormonok (auxin, ABA, GA3) hatása az aktivátor *E2F* és *RBR* gén expressziójára fiatal csíranövényben és érett magban.**

Az Arabidopsis eFP Browser adatbázisából származó génexpressziós adatok segítségével megvizsgáltuk, hogyan befolyásolják az embriófejlődést szabályzó hormonok az aktivátor *E2F* és *RBR* gén expresszióját. Vad típusú csíranövényekben vizsgálták meg, hogy az adott hormonkezelés (1μM auxin, 10μM ABA, 1μM GA3) milyen expressziós változást okozott a vizsgált gén esetében 30 perccel, 1 órával és 3 órával a kezelést követően.

Csíránövényben az *E2FA* expressziója az ABA kezelés elején kis mértékben megemelkedett, de ez az emelkedett expresszió a kezelés többi pontján már nem volt látható, míg az auxin és a GA3 a kezelés végén emelte meg kis mértékben az *E2FA* expresszióját. Az *E2FB* expressziója csíránövényben az auxin kezelés elején kissé lecsökken, míg a kezelés végére inkább megemelkedik. Az ABA kezelés végén is kismértékben megemelkedik az *E2FB* expressziója. A GA3 kezelés nem volt lényeges hatással az *E2FB* expressziójára. Az *RBR* expressziója az auxin és az ABA kezelés hatására is megemelkedett a csíránövényekben a hormonkezelés végére, de míg az auxin csak kis mértékben emelte meg az expresszióját, addig az ABA esetében másfélszeres növekedés történt. A GA3 kezelés a *RBR* expressziójában sem okozott lényeges változást. Érett magokon is megvizsgálták, hogy az adott hormonkezelés (3 $\mu$ M és 30 $\mu$ M ABA és 5 $\mu$ M GA3) milyen expressziós változást eredményez a vizsgált gének expressziójában. GA3 esetében 3, 6 és 9 órával a kezelést követően. A kezelést megelőzően az *E2FA* alacsonyan, míg az *E2FB* magasan expresszál az érett magban. Csírázáskor az *E2FA* expressziója megemelkedik, míg az *E2FB* expressziója lecsökken. Az ABA kezelés kis mértékben megemeli az *E2FB* expresszióját a magban. Az *E2FB* expressziója GA3 hatására is kis mértékben emelkedik meg, de csak a kezelés közepén. Kis mennyiségű ABA kezelés kis mértékben emeli meg az *E2FA* expresszióját a magban, míg GA3 kezelés hatására duplájára emelkedik az *E2FA* expressziója a kezelés végére. Sem az ABA sem a GA3 kezelés nem befolyásolja jelentősen az *RBR* expresszióját a magban.



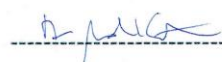
# NYILATKOZAT

## NYILATKOZAT

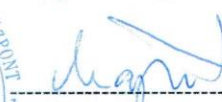
Mint az alábbi közlemények felelős és/vagy első szerzője igazolom, hogy Vaskó-Leviczky Tünde Ph.D. jelölt jelentős mértékben hozzájárult az alábbi tudományos publikáció létrehozásához és tézisében közölt eredményeit más Ph.D. értekezésben nem használjuk fel.

Leviczky, T., Molnár, E., Papdi, C., Őszi, E., Horváth, G.V., Vizler, C., Nagy, V., Pauk, J., Bögre, L., Magyar, Z. (2019) **E2FA and E2FB transcription factors coordinate cell proliferation with seed maturation.** Development 146(22):dev179333.

Szeged, 2020.09.18.

  
Dr. Molnár Eszter  
Tudományos munkatárs  
Szegedi Biológiai Kutatóközpont




  
Dr. Magyar Zoltán  
Tudományos főmunkatárs  
Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Kobayashi, K., Suzuki, T., Iwata, E., Nakamichi, N., Suzuki, T., Chen, P., Ohtani, M., Ishida, T., Hosoya, H., Müller, S., **Leviczky, T.**, Pettkó-Szandtner, A., Darula, Z., Iwamoto, A., Nomoto, M., Tada, Y., Higashiyama, T., Demura, T., Doonan, J.H., Hauser, M.T., Sugimoto, K., Umeda, M., Magyar, Z., Bögre, L., Ito, M. (2015) **Transcriptional repression by MYB3R proteins regulates plant organ growth.** EMBO J. 34(15):1992-2007.

Szeged, 2020. 09.18.



  
Dr. Magyar Zoltán  
Tudományos főmunkatárs  
Szegedi Biológiai Kutatóközpont